

Technická univerzita v Liberci

Fakulta mechatroniky a mezioborových inženýrských studií

Studijní program: N2612 – Elektrotechnika a informatika

Studijní obor: 1802T007 – Informační technologie

**Využití analýzy obrazu k hodnocení bakteriálního
biofilmu na nosičích biomasy**

**Image analysis in the evaluation of bacterial biofilm on
biomass carriers**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Petr Divíšek
Vedoucí práce:	Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.
Konzultant:	Ing. Lucie Křiklavová
V Liberci	17. 5. 2013

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval panu Mgr. Ing. Lukáši Dvořákovi, Ph.D. a Ing. Lucii Křiklavové za čas, který mi věnovali, a za cenné připomínky a rady, které přispěly k vylepšení této práce. Dále bych rád poděkoval celému kolektivu profesorů z Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, kteří mi byli nápomocni v otázkách týkajících se předkládané diplomové práce, kdykoli bylo potřeba.

Také bych chtěl poděkovat celé mé rodině, hlavně mé matce, která mi byla po celou dobu mého studia velkou psychickou podporou.

Podpis:

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá charakterizací tvorby a vývoje biofilmu na povrchu zvolených nosičů biomasy (komerční AnoxKaldnes K3, vyvíjený PAQ_34 a nanovláknový vyráběný TUL), které se používají pro fluidní lože při čištění odpadních vod. Sledování nosičů probíhalo prostřednictvím technik analýzy obrazu za pomoci programového prostředí MATLAB. Pomocí vytvořeného softwaru, jakožto nástroje pro kvantifikaci výsledků, byly u mikroskopických snímků stanoveny základní charakteristiky 2D struktur bakteriálního biofilmu. Předností obrazové analýzy z hlediska praxe je mimo jiné neinvazivní charakter metodiky, což umožňuje opětovné využití vzorku.

Cílem práce bylo pomocí obrazové analýzy určit kinetiku růstu bakteriální populace a její charakterizace na daných typech nosičů v závislosti na čase, při odlišných hodnotách solnosti média a míry aerace. Dále byl studován vliv mediánového filtrování obrazu při hodnocení strukturních parametrů bakteriálního biofilmu.

Klíčová slova: bakteriální biofilm, nosič biofilmu, obrazová analýza, charakterizace 2D struktur, nanovláknna.

Abstract

The presented thesis deals with characterization of the biofilm formation and development on the surface of the selected biomass carriers (commercial carrier AnoxKaldnes K3, carrier PAQ_34 being developed and nanofiber carrier produced by TUL) usually used for fluidized bed in the wastewater treatment process. The carriers were monitored via the techniques of an image analysis, utilizing the MATLAB programming environment. Using the created software which is the tool for the quantification of the results, the basic characteristics of the 2D structures of the bacterial biofilm were determined in the microscopic images. From the practice point of view, main advantage of this method is its non-invasive character allowing the sample reuse.

The thesis aims at the determination of the growth kinetics of the bacterial population and its characterization on the particular carrier types by the image analysis, depending on time, in case of the different salinity values of a solution and the aeration rate. Furthermore, the influence of a median image filtering during the evaluation of the structural parameters of the bacterial biofilm was studied.

Key words: bacterial biofilm, biofilm carrier, image analysis, characterization of the 2D structures, nanofibers.

Obsah

PROHLÁŠENÍ	3
PODĚKOVÁNÍ	4
ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	6
1 ÚVOD.....	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 BAKTERIÁLNÍ BIOFILM	15
2.1.1 Vznik biofilmu	15
2.1.2 Struktura biofilmu	16
2.1.3 Signály v biofilmu.....	17
2.2 BIOLOGICKÉ ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD	18
2.2.1 Aktivační proces	19
2.2.2 Proces biodegradace, bakteriální růst	20
2.2.3 Nosiče biofilmu používané při biologickém čištění odpadních vod.....	20
2.3 OBRAZOVÉ HODNOCENÍ STRUKTURY BIOFILMU	22
2.3.1 Typy snímků	24
2.3.2 Hodnocení strukturních parametrů snímků biofilmu	25
2.3.3 Prahování snímků biofilmu	29
2.3.4 Plošná porozita AP	29
2.3.5 Průměrná délka běhu ARL.....	30
2.3.6 Difuzní vzdálenost DD	31
2.3.7 Obvod (hranice)	32
2.3.8 Fraktální dimenze FD	33
2.3.9 Rušivé vlivy metod obrazové analýzy na kvantifikaci parametrů	34
3 PRAKTICKÁ ČÁST	38
3.1 POPIS POUŽITÝCH NOSIČŮ BIOFILMU	38
3.2 BAKTERIÁLNÍ KULTURA	39
3.3 PROVOZ A MONITORING LABORATORNÍCH BIOREAKTORŮ	39
3.3.1 Laboratorní experiment 1	40
3.3.2 Laboratorní experiment 2.....	41
3.3.3 Měřené veličiny	42
3.3.4 Tvorba snímků vázané populace (biofilmu)	43

3.4	OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMU	45
3.4.1	Digitalizace, předzpracování snímků.....	46
3.4.2	Transformace barev, převod RGB snímků do jiného barevného prostoru	47
3.4.3	Grafické uživatelské rozhraní	50
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
4.1	VÝSLEDKY OBRAZOVÉHO HODNOCENÍ 2D PARAMETRŮ	54
4.1.1	Počet objektů.....	54
4.1.2	Obvod objektů.....	58
4.1.3	Plošná porozita AP.....	61
4.1.4	Maximální difuzní vzdálenost (MDD).....	64
4.1.5	Mohutnost biofilmu	68
4.1.6	Vliv mediánového filtrování	69
5	ZÁVĚR.....	72
	SEZNAM LITERATURY	75
	PŘÍLOHA A – OBSAH DVD	79

Seznam symbolů a zkratek

ADD	Průměrná difuzní vzdálenost
AHRL	Průměrná horizontální délka běhu
AP	Plošná porozita
ARL	Průměrná délka běhu
AVRL	Průměrná vertikální délka běhu
BSK ₅	Biochemická spotřeba kyslíku za pět dní
CSLM	Konfokální skenovací laserová mikroskopie
ČOV	Čistírna odpadních vod
DD	Difuzní vzdálenost
ECP	Extracelulární polymerní látky
FBBR	Biofilmový reaktor s fixovanými nosiči biomasy (Fixed Bed Biofilm Reactor)
FD	Fraktální dimenze
GLCM	Matice vzájemného výskytu úrovní šedi v obraze (Gray level co-occurrence matrix)
H	Homogenita
H _{max}	Maximální hodnota barevného tónu
H _{min}	Minimální hodnota barevného tónu
HRL	Horizontální délka běhu
L _{max}	Maximální hodnota světlosti
L _{min}	Minimální hodnota světlosti
MBBR	Biofilmový reaktor s volně se pohybujícími nosiči biomasy (Moving Bed Biofilm Reactor)
MDD	Maximální difuzní vzdálenost
PAQ ₃₄	Polyethylenový nosič vyvíjený společností PRO-AQUA CZ a TUL
P _H	Počet změn na stupnici šedi mezi $a \rightarrow b$ v horizontálním směru v obraze
P _{HV}	Celkový počet změn intenzity šedi z $a \rightarrow b$ a z $b \rightarrow a$ součtem horizontálním i vertikálním směru
P _V	Počet změn na stupnici šedi mezi $a \rightarrow b$ ve vertikálním směru v obraze
S _{max}	Maximální hodnota sytosti
S _{min}	Minimální hodnota sytosti
TE	Texturní entropie

VRL

Vertikální délka běhu

Seznam obrázků

Obr. 1: Pohyblivé nosiče biofilmu: nanovláknenný nosič (a), polyethylenový nosič (b) [17].....	22
Obr. 2: Metoda elektrostatického zvlákňování (a), způsoby fixace nanovláken na inertní podkladový materiál (b) [13]	22
Obr. 3: Snímek biofilmu k sestavení matice prostorové závislosti.....	27
Obr. 4: Binární snímek použitý pro ukázkový výpočet AP	30
Obr. 5: Horizontální a vertikální délky běhu	30
Obr. 6: Schéma buněčného shluku (HRL – horizontální délka běhu, VRL – vertikální délka běhu, DD – difuzní vzdálenost) [20]	32
Obr. 7: Výpočet euklidovské vzdálenosti (b) z původního snímku (a)	32
Obr. 8: Obvod (hranice)	33
Obr. 9: Dilatace objektu o různých poloměrech dilatačních kruhů [20].....	33
Obr. 10: Vliv mediánového filtrování obrazu na hodnocené parametry	36
Obr. 11: Fotografie testovaného komerčního typu nosiče biofilmu AnoxKaldnes K3 [17]	38
Obr. 12: Druhý testovaný typ nosiče biofilmu PAQ_34 [17]	38
Obr. 13: Pletenina z příze s nanovláknenným povrchem	39
Obr. 14: Laboratorní experiment 1 provozovaný v rámci této diplomové práce.....	40
Obr. 15: Zkumavky s nosiči biofilmu umístěné na třepačce	42
Obr. 16: Vyhlazení nečistot na pozadí nanovláknenného nosiče	46
Obr. 17: Geometrická reprezentace modelu CIELAB [39]	48
Obr. 18: Geometrická reprezentace modelu HLS [40]	49
Obr. 19: Nově vytvořené grafické uživatelské rozhraní GUI.....	51
Obr. 20: Ukázka segmentace analyzovaného obrazu	53
Obr. 21: Počet lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1).....	55
Obr. 22: Počet lokalizovaných objektů na nanovláknenném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1).....	56
Obr. 23: Počet lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	56

Obr. 24: Počet lokalizovaných objektů na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	57
Obr. 25: Časový vývoj nárůstu biofilmu na testovaných nosičích	58
Obr. 26: Obvod lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1).....	59
Obr. 27: Obvod lokalizovaných objektů na nanovlákných nosičích biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)	60
Obr. 28: Obvod lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	61
Obr. 29: Obvod lokalizovaných objektů na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	61
Obr. 30: Plošná porozita na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1).....	62
Obr. 31: Plošná porozita na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)	63
Obr. 32: Plošná porozita na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)	64
Obr. 33: Plošná porozita na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	64
Obr. 34: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1).....	65
Obr. 35: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)	66
Obr. 36: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	67
Obr. 37: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nanovlákném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2).....	67

Obr. 38: Vývoj mohutnosti biofilmu na nanovlákněném nosiči při rozdílných hodnotách salinity média reaktoru.....	69
Obr. 39: Vliv mediánového filtrování na parametry 2D struktur	70

Seznam tabulek

Tab. 1: Množství salinity v bioreaktorech	54
---	----

1 ÚVOD

Mikroorganismy se v přirozeném prostředí nejčastěji vyskytují nikoli ve formě planktonické, nýbrž jako společenství složitých útvarů přisedlá na pevném podkladu, čímž vzniká biofilm, který jim poskytuje mimo jiné i ochranu před nežádoucími vlivy. V dnešním světě se člověk s bakteriálním biofilmem setkává dnes a denně, ať už se jedná o biofilm v podobě zubního plaku, plísní nebo biofilm výrobních/přepravních zařízení, kde způsobuje korozi materiálů či kontaminaci produktů. Z těchto důvodů je v současnosti pozornost zaměřena především na podmínky tvorby biofilmu (vliv teploty, hodnoty pH apod.) a na následnou eliminaci problémů spojených s mikrobiálními biofilmy. Tvorba biofilmu však nepřináší jen negativa. Formace takových uskupení jsou úspěšně využívány při degradaci toxických látek, k čištění zápachajícího vzduchu nebo odpadních vod, a proto v současné době existuje několik metod, které se hodnocením bakteriálního biofilmu, potažmo jeho struktury, zabývají.

K analýze struktury bakteriálního biofilmu je nutné zvolit správný postup a metodiku tak, aby výsledné hodnocení bylo co nejobjektivnější. Jedna z takových metod hodnocení bakteriální populace, často užívaných v praxi, je metoda analýzy mikroskopického obrazu. Tato metoda má neinvazivní charakter a mnohdy poskytuje v jistých směrech více použitelných výsledků, než jak je tomu u běžně užívaných metod, jako je např. metoda stanovení sušiny. Výhodou obrazové analýzy je efektivita hodnocení velkého množství vstupních dat/parametrů, objektivita, rychlost zpracování a prezentace snímků.

Hlavním cílem práce bylo využití moderního přístupu analýzy obrazu k hodnocení bakteriálního biofilmu na nosičích biomasy, a to pomocí nově vytvořeného programového kódu, který bude charakterizovat tento biofilm. Na jednotlivé mikroskopické snímky biofilmu bylo nahlíženo z více hledisek, které charakterizovaly jednotlivé aspekty obrazového hodnocení a rozdělovaly hledané parametry reprezentující požadovanou charakteristiku biofilmu na plošné a texturní. Dalším cílem práce bylo definovat strukturu bakteriálního biofilmu neinvazivní metodou tak, aby výsledky měly stejnou nebo lepší vypovídací hodnotu než výstupy standardních invazivních metod. Část diplomové práce je také věnována posouzení dopadu modifikace jednotlivých obrazových bodů na základě vlastností okolních pixelů v podobě mediánového filtrování na hodnoty parametrů 2D struktur.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BAKTERIÁLNÍ BIOFILM

Historicky první biofilm byl pozorován a následně popsán na konci 19. století Anthonem van Leeuwenhoekem. Jednalo se o biofilm přítomný v lidském organismu, a to ve formě zubního plaku. Biofilm je definován jako organizované společenstvo bakterií i vyšších organismů tvořící různé povlaky na různých površích, přičemž je nezbytná přítomnost vody, kyslíku a živin [1]. Charakteristiky povrchové struktury bakterií umožňují jejich fixaci k nejrozličnějším povrchům i vzájemnou agregaci jednotlivých bakteriálních buněk [1, 2]. Tato společenstva jsou obklopena maticí tvořenou extracelulárními polymery, které chrání bakterie biofilmu před nepříznivými vnějšími vlivy, jako např. před vysokou teplotou, přítomností toxických látek aj.

Biofilm se vyskytuje především ve vodním prostředí, jako jsou potoky, řeky, odpadní vody nebo průmyslové organické odpady, ale také na povrchu půdy. Svým výskytem přináší řadu nežádoucích problémů, neboť se podílí na korozi kovů, např. na korozi nádrží paliva a ropovodů. Na druhou stranu jsou biofilmy využívány při degradaci toxických látek a v systémech při biologickém čištění odpadních vod, kdy biofilm fixovaný na povrchu inertních nosičů přispívá k efektivnímu čištění odpadních vod [1, 2].

2.1.1 *Vznik biofilmu*

Vzhledem ke své fenotypové přizpůsobivosti patří bakterie k nejúspěšnější formě života na Zemi. Mohou se vyskytovat buď planktonicky jako volně se pohybující buňky/větší aglomeráty, nebo ve společenství mikrobiálního biofilmu. Fixace a následná tvorba biofilmové struktury je pro bakterie z mnoha důvodů výhodná, jelikož umožňuje např. zvýšenou rezistenci k antimikrobiálním látkám. Ve většině prostředí je biofilm základní způsob přirozené existence mikroorganismů [1, 3].

K formování mikrobiálního biofilmu dochází mimo jiné i v případě, pokud volně se pohybující planktonické buňky mají nedostatek substrátu. Fixace k pevnému povrchu prostřednictvím aktivních molekul produkovaných bakteriemi může totiž zajistit požadovaný přísun živin. Výše zmiňované molekuly jsou označovány jako „adheziny“. Mohou to být molekuly látek různé povahy – bílkoviny či polysacharidy, které se vyskytují na vnějším povrchu buněk bakterií. Po fixaci bakterií k povrchu dochází ke

změně jejich vlastností (zpočátku jen na úrovni regulace genů), čímž se zároveň změní i jejich fenotyp. Bakterie postupně uvolňují do okolního prostředí velké množství polysacharidů, ze kterého následně vzniká gelová matrice. Matrice je uspořádána do „pavučinovitých“ vláken, čímž udržuje buňky pohromadě a vytváří tak podporné struktury, v kterých se buňky reprodukují, a tím vytvářejí mikrokolonie. Za určitých podmínek může dojít také k odtržení buňky z mikrokolonie. Buňka tak přechází do planktonického stavu a může kolonizovat další část povrchu. Příčinou odtržení buňky může být koordinace genové exprese bakterií v závislosti na lokální hustotě populace [1, 3, 4].

Biofilm je charakteristický svojí vysokou biodiverzitou, tzn., že je tvořen více bakteriálními druhy, které tvoří mikrokolonie. Jednotlivé mikrokolonie jsou navzájem propojené množstvím spletitých kanálků tvořících póry [5, 6].

2.1.2 *Struktura biofilmu*

Struktura biofilmu je velkou měrou ovlivněna vlastnostmi prostředí (hodnota pH, hydrodynamické síly apod.), ve kterém se mikroorganismy nacházejí. Dalším faktorem podmiňujícím strukturní charakter biofilmu je přítomnost a dostupnost živin, kyslíku nebo přítomné druhy bakterií. Vzhledem k rozmanitosti prostředí, ve kterém mohou bakterie vytvářet kolonie, potažmo biofilm, je zaručena existence velké škály různých forem a struktur biofilmu [2].

Tloušťka biofilmu je závislá na přístupnosti živin a na jeho biodiverzitě. Může nabývat hodnot od několika jednotek až po stovky mikrometrů. Biofilm, který je tvořen více bakteriálními kmeny, je přirozenější a v přírodě se vyskytuje častěji než biofilm tvořený jedním bakteriálním kmenem vyskytující se například v laboratorním prostředí. Struktura biofilmu není homogenní a je složena z četných dutin a shluků buněk, které vytvářejí různorodé tvary spletitých a mezi sebou vzájemně propojených kanálků. Pro vznik biofilmu je také důležitá koncentrace rozpuštěných plynů v těchto kanálcích, a to především kyslíku, který je podstatný pro společnou existenci aerobních a anaerobních bakterií v různých tloušťkách biofilmu. Nízké hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku se vyskytují na povrchu, o trochu níže koncentrace stoupá a s postupem do hlubších vrstev biofilmu opět klesá. Dílčí vrstvy biofilmu jsou odlišně elektricky nabitě, což napomáhá transportu živin do jednotlivých vrstev [1, 3].

Jelikož povrch biofilmu vykazuje elastické vlastnosti, má tendenci se v proudu tekoucí kapaliny chovat dynamicky, „vlnit se“. Je-li biofilmový nárost vystaven působení silného proudu okolní kapaliny, dochází k jeho posunu ve směru toku kapaliny, čímž obsazuje volná místa. Pokud je však proud kapaliny příliš silný a elasticita nestačí udržet buňky pohromadě, dochází k rozpadu biofilmové struktury. Mechanické pnutí („vlnění“) v biofilmovém nárostu je tlumeno dostatečným, ev. nadbytečným obsahem glukózy, přičemž se znovu objevuje při poklesu koncentrace glukózy [1, 3, 4].

Organické i anorganické látky jsou do biofilmu distribuovány na základě koncentračního gradientu mezi biofilmem a okolní kapalinou. Naopak, odpadní látky, resp. produkty metabolismu jsou okolní kapalinou odváděny pryč. Veškeré látky jsou společně s kyslíkem transportovány do a z hlubších vrstev již dříve zmíněnou soustavou kanálků. Rychlost proudění v kanálkách se směrem k hlubším vrstvám biofilmu postupně snižuje, přičemž v polovině tloušťky biofilmu je průtok v porovnání s rychlostí proudění na povrchu přibližně poloviční. Látky jsou transportovány kapalinou z kanálků do nitra větších mikrokolonií pomocí pórů a do určité hloubky prostřednictvím difuze [1].

V prostředích bohatých na vysoký obsah živin jsou biofilmy více ucelené a do matric je soustředěno více živin z vnějšího okolí. Příkladem takového prostředí jsou odpadní vody [2].

2.1.3 Signály v biofilmu

V husté populaci mikrobiálního společenstva jsou hlavním prostředkem pro vzájemnou komunikaci chemické signály. Ty vycházejí z jednotlivých bakterií a umožňují bakteriím reagovat na svůj počet (hustota populace) v určitém prostoru, a tím případně zabránit nadměrnému nárůstu společenstva. Jedná se o určitou formu teritoriální kompetence. Tento jev je v praxi označován jako „Quorum sensing“, tedy vnímání množství [1]. Regulační mechanismus Quorum sensing je založen na produkci signálních molekul zvaných autoinduktory. Autoinduktory jsou transportovány vně buněk, kde jsou následně detekovány okolními bakteriálními buňkami. Poté může dojít k ovlivnění jejich chování, přičemž buňky nemusí být nutně stejného bakteriálního kmene [1, 4].

Stavební matrice tvořená polysacharidy udržuje buněčné agregáty pohromadě, čímž je umožněna tvorba dostatečného množství signálních molekul podněcujících regulaci buněčných funkcí. Některé enzymy, které určují charakter i rychlost chemických reakcí a řídí také většinu biochemických procesů, jsou aktivovány bakteriemi pouze tehdy, jestliže přijímají transportované autoinduktory v dostatečném množství pro bezpečné využití genetické aktivity. Jako příklad lze uvést bakteriální produkci toxinů. Bakterie produkují toxiny pouze v okamžiku, když obdrží signální informaci o jejich dostatečném množství na daném místě a v čase. Dostatečné množství jim umožňuje odolávat negativním vlivům vyvolaných hostitelovým obranným systémem [1, 4, 5].

2.2 BIOLOGICKÉ ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

Princip biologického čištění odpadních vod je založen na odstraňování organického znečištění (eventuálně i dusíku a fosforu) pomocí metabolického působení mikroorganismů, zejména bakteriálních společenstev. Odpadní vodu je možné biologicky čistit jen v případě, že obsahuje organické látky schopné biochemického rozkladu (biodegradace). Jedná se o stimulování, regulaci a intenzifikaci přirozených rozkladných procesů organických i anorganických látek probíhajících přirozeně ve vodním i půdním prostředí. Nejrozšířenějším způsobem biologického čištění odpadních vod jsou v současné době procesy probíhající za aerobních podmínek, tedy za přítomnosti, resp. dodávky kyslíku do systému. Výhodou aerobních procesů je rychlejší rozklad či transformace znečišťujících látek. Konečným produktem aerobního rozkladu organických látek je oxid uhličitý a voda [7, 8, 9].

Odpadní vody je možné biologicky čistit dvěma způsoby [8]:

- přírodní způsoby čištění (někdy označované jako „samočištění“),
- umělé (regulovatelné) způsoby čištění.

V případě přírodního způsobu probíhá čištění v přirozených podmínkách, na rozdíl od umělého způsobu čištění, které se odehrává v podmínkách vytvořených a udržovaných cíleně. Během regulovaných procesů čištění odpadních vod probíhají degradační procesy výrazně rychleji než u čištění přirozeného. Této skutečnosti je dosahováno v důsledku nejrůznějších technologických procesů vytvářejících co nejlepší podmínky pro rozvoj a optimální metabolickou aktivitu mikroorganismů. Principem biologického čištění odpadních vod je využití složek z odpadní vody jako zdroje energie

a substrátu, tj. živné látky esenciální pro růst a tvorbu nové biomasy všech mikrobiálních společenstev. V technologickém procesu při čištění odpadních vod mohou být mikroorganismy zajišťující biodegradaci přítomny ve formě suspenze (aktivační proces) nebo fixovány na různé typy inertních nosičů biomasy (biofilmové reaktory) [8, 9, 10].

2.2.1 Aktivační proces

Aktivační proces je v praxi velmi často využívaným způsobem biologického čištění odpadních vod, a to jak městských, tak i průmyslových odpadních vod s vysokým obsahem organického znečištění. Průběh tohoto procesu je umožněn činností společenstva mikroorganismů, tzv. aktivovaným kalem. Aktivovaný kal představuje heterogenní směs nejrozličnějších skupin mikroorganismů i vyššího osídlení, ovšem přibližně z 95 % je tvořen bakteriemi. Ty mohou být v suspenzi volně dispergované či agregovány do podoby kompaktnějších celků – vloček.

Aktivovaný kal vzniká po určité době samovolně v provzdušňované odpadní vodě z již přítomných bakterií. Ovšem tento způsob kultivace se v praxi nevyužívá a čistírna odpadních vod je obvykle inokulována aktivovaným kalem z jiné čistírny odpadních vod. Aktivovaný kal transformuje nežádoucí složky odpadní vody přímým enzymatickým rozkladem nebo nepřímým pohlcováním drobných částic. Látky představující znečištění odpadních vod jsou využívány mikroorganismy aktivovaného kalu a slouží jako zdroj energie a uhlíku, které jsou nezbytné pro všechny životní pochody a pro syntézu nových buněk. Zároveň dochází k nárůstu nové biomasy aktivovaného kalu a ke snížení obsahu organických látek. V technologické lince ČOV se aktivační proces odehrává v tzv. aktivační nádrži. Po reakci je suspenze aktivovaného kalu vedena do tzv. dosazovací nádrže, kde se gravitačně odděluje aktivovaný kal a vyčištěná odpadní voda. Část aktivovaného kalu je následně vracena zpět do aktivační nádrže (recirkulace), čímž se udržuje jeho požadovaná koncentrace v systému, která je potřebná pro dostatečně rychlý biochemický rozklad organických látek, ev. dusíkatých látek a fosforu. Přebytný aktivovaný kal je odstraněn a následně zpracován spolu s dalším kalem vznikajícím na ČOV [5, 8].

Složení aktivovaného kalu je mimo jiné ovlivněno schopností dílčích druhů mikroorganismů využívat odpadní vodu jako substrát, dále možností dalšího růstu

společenstva a také schopností organismů se dále rozmnožovat v podmínkách daného čistírenského zařízení [8, 9].

2.2.2 *Proces biodegradace, bakteriální růst*

Pod pojmem biodegradace se dle literatury [11] obecně rozumí biologické odbourávání organických látek. Biodegradace je prováděna zejména mikroorganismy, které tvoří zásadní prvek každé bioremediační technologie a disponují také bohatším metabolismem vzhledem k vyšším organismům. Týká se jak přírodních látek, tak zejména látek distribuovaných do environmentálního prostředí lidským faktorem. Nárůst mikroorganismů je úzce spjat s vhodnými podmínkami pro jejich růst. Tyto podmínky jsou odlišné vzhledem k typu mikroorganismu a živného média. Rychlost růstu závisí na mnoha faktorech. Hlavními faktory jsou [11, 12]:

- koncentrace přiváděného substrátu,
- typ znečištění,
- obsah živin,
- obsah kyslíku ve vodě,
- teplota,
- hodnota pH.

Mikroorganismy potřebují ke svému růstu a reprodukci celou řadu přirozených organických/anorganických látek, které využívají jako zdroj uhlíku, energie, dusíku, fosforu, síry nebo jiných prvků nutných pro život buňky. Odpadní vody ve městech jsou zpravidla bohaté na tyto živiny, naopak v průmyslových odpadních vodách je obvykle některých živin nedostatek. Růst mikroorganismů je proto v některých případech stimulován přidávkou anorganických sloučenin dusíku a fosforu [5, 8].

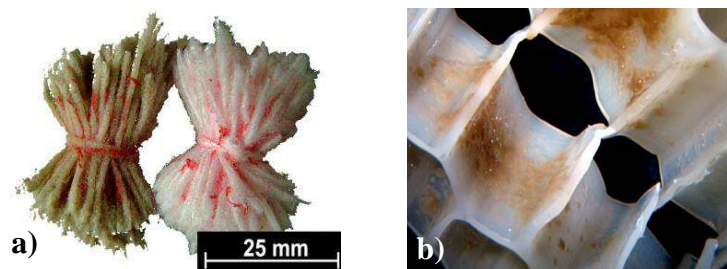
2.2.3 *Nosiče biofilmu používané při biologickém čištění odpadních vod*

V současné době existuje velká škála nosičů, s různými tvary nebo velikostmi povrchových ploch, které je možné charakterizovat jako nosné prvky bakteriálních biovrstev. Nosiče biofilmu musí disponovat dostatečnou porozitou v intervalu od 40 do 60 %.

Dle literatury [např. 13, 14] lze obecně shrnout požadované funkce a vlastnosti na nosiče biofilmu:

- fyzikální, chemická a biologická stabilita;
- vhodná morfologie povrchu a maximální specifický povrch;
- kolonizovatenost a biokompabilita;
- struktura zajišťující co nejvyšší pravděpodobnost výskytu látek nezbytných pro činnost mikroorganismů v blízkosti povrchu nosiče.

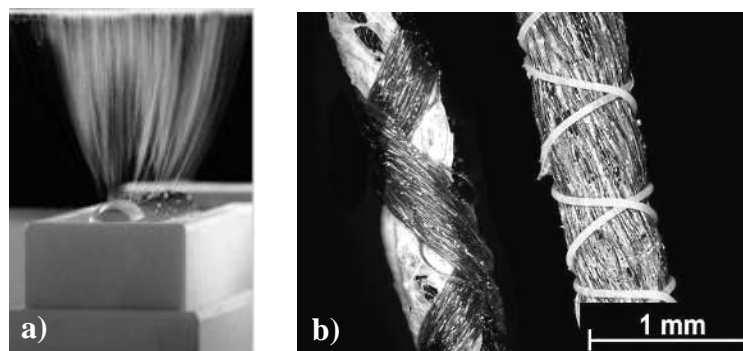
Nosiče biofilmu jsou v procesech čištění odpadních vod využívány v podstatě dvojím způsobem. Jednak mohou být fixovány na nejrůznějších konstrukčních vestavbách a následně umístěny do nádrží (v tom případě mluvíme o tzv. FBBR neboli též Fixed Bed Biofilm Reactor) či jako volně se pohybující tělíska – MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor). V tomto případě probíhá fixace mikroorganismů a následná tvorba biofilmové struktury na mechanicky pevných inertních tělískách, která jsou udržována ve vztahu prostřednictvím hydrodynamických sil. Specifickou vlastností pro tyto technologie je kompaktnost, vysoká účinnost odstraňování organických látek vyjádřených sumárním parametrem BSK_5 a dusíku, jednoduchost provozu a nenáročná údržba. Pohyblivé nosiče biomasy/biofilmu (viz Obr. 1), jakožto základní prvek technologie MBBR, jsou nejčastěji vyrobeny z polyetylénu a mají hustotu jen mírně nižší než je hustota vody. Hustota nosičů biomasy může být navíc do jisté míry upravována, a to v závislosti na potřebách dané aplikace. Nosiče biomasy jsou obvykle kruhovitěho tvaru s vnitřním žebrovaním, což významným způsobem zvyšuje velikost povrchu využitelnou pro fixaci mikroorganismů a dále umožňuje snadné proudění substrátu k fixovaným mikrokoloniím. Tvar nosičů biofilmu je navrhován tak, že chrání mikroorganismy před případným mechanickým působením a zároveň jim poskytuje vysoký přísun látek potřebných k růstu. Nosiče jsou udržovány v neustálém pohybu buď prostřednictvím dodávaného vzduchu (aerobní systémy, což je většina aplikací) nebo mícháním pomocí míchadel (anoxické, eventuálně anaerobní systémy). Díky neustálému pohybu je zajištěn velmi efektivní kontakt biofilmu a složek odpadní vody, čímž jsou zároveň do jisté míry urychleny i biodegradační procesy, respektive dochází ke snižování obsahu těchto látek v odpadních vodách [15, 16].



Obr. 1: Pohyblivé nosiče biofilmu: nanovláknenný nosič (a), polyethylenový nosič (b) [17]

Poslední dobou jsou také jako nosiče biofilmu nově testovány nejrůznější tvarové modifikace pletenin s povrchem modifikovaným nanovláknem (viz např. Obr. 1 a)). Základními výrobními materiály pro tyto nosiče biofilmu mohou být různé polymery (více než 50 druhů), ovšem jen některé lze využít jako materiál pro aplikace v čistírnách odpadních vod [5, 13, 18].

Sledované parametry při přípravě nanovláken se nikterak neodlišují od definičně obdobných parametrů popisujících makroskopická vlákna. Jedná se například o průměr a délku vlákna, plošnou nebo objemovou hmotnost, porozitu či měrný povrch. Často využívanou metodou v přípravě nanovláken je elektrostatické zvlákňování, tzv. Electrospinning (Obr. 2 a)). Základním principem Electrospinningu je využití účinku elektrostatického pole na elektricky nabitý roztok polymeru k vytvoření velmi tenkých vláken. Tloušťka nanovláken touto metodou může nabývat hodnot od desítek nanometrů až po hodnoty udávané v jednotkách mikrometrů [13, 19].



Obr. 2: Metoda elektrostatického zvlákňování (a), způsoby fixace nanovláken na inertní podkladový materiál (b) [13]

2.3 OBRAZOVÉ HODNOCENÍ STRUKTURY BIOFILMU

Kvantifikace struktury biofilmu nabývá v současnosti nových rozměrů. Tato skutečnost vyšla najevo, když bylo zjištěno, že struktura biofilmu má vliv především na

rychlost a možnosti transportu živin do hlubších vrstev, čímž je zároveň ovlivněna také mikrobiální aktivita a míra růstu biofilmu (biovrstev). Podrobné studie dokumentují, že struktura biofilmu určuje hromadný transportní mechanismus hmoty v prostoru obsazeném biofilmem stejně jako poblíž nebo uvnitř biofilmu. Strukturální rysy různých biofilmů jsou vzhledově odlišné a není vyloučeno, že tyto rozdíly jsou způsobeny účinky vlivů okolního prostředí, jako jsou hydrodynamické podmínky, chemické a fyzikální charakteristiky média aj. Je také pravděpodobné, že struktura biofilmu odráží základní procesy, které v něm probíhají, a to přichycení, oddělení a růst mikroorganismů. Jestliže jsou tyto hypotézy, respektive vztahy mezi strukturou a procesy probíhajícími v biofilmu pravdivé, pak kvantifikace struktury biofilmu bude poskytovat přístup ke studiu procesů v biofilmu. K ověření těchto hypotéz je třeba sledovat a detailně vyhodnotit vhodnými prostředky strukturu biofilmu [5, 6, 20].

Popis struktury bakteriálního biofilmu byl ještě před několika lety omezen na kvantifikaci plošné porozity a fraktální dimenzi [5]. V současné době však byly vyvinuty nové sady měření, které v sobě zahrnují i procesy probíhající v biofilmu. Kvantifikace vztahů mezi strukturou a procesy v biofilmu poskytne nové možnosti v oblasti detailního výzkumu biofilmu. Struktura biofilmu rovněž poskytuje informace o jeho vývoji a může být použita jako prostředek k bližší specifikaci jevů, které nastaly při tvorbě biofilmu. Např. je známo, že k tvorbě hustých struktur biofilmů dochází buď z důvodu vysokého smykového napětí, nebo v důsledku nedostatku substrátu [6]. Proto ze vzorků neznámého hustě osídleného biofilmu může tvar mikrokolonií poskytnout informaci, zda se hustota biofilmu zvýšila z důvodu nedostatku či úplné absence substrátu nebo z důvodu dlouhodobějšího působení vysokého smykového napětí [6, 20].

Pojem biofilm byl zpočátku používán pro vyjádření struktury biofilmu popisující jeho morfologii. V průběhu času mnozí autoři začali používat tento termín jako synonymum pro heterogenitu biofilmu, nepřímě odkazující na různé druhy heterogenity, tj. fyziologickou, chemickou a genetickou. Význam heterogenity je spjat s nejednotnou distribucí nějakého významného prvku v prostoru obsazeného biofilmem, např. nejednotné rozdělení biomasy nebo fyziologických skupin mikroorganismů [6].

Strukturu biofilmu (prostorové rozložení biomasy) v prostoru obsazeném biofilmem je třeba stanovit podle řady sofistikovaných měření, která jsou citlivá na přítomnost biomasy. Příkladem takové sady měření je kvantifikace lokální efektivní difuzivity, která souvisí s hustotou biomasy, resp. plochou, která je zastoupena biomasou. Nicméně hodnoty efektivní vodivosti jsou měřeny pouze na vybraných

místech v biofilmu. Proto je nutné uskutečnit těchto měření více, aby bylo možné stanovit rozdělení biomasy v celém prostoru obsazeném biofilmem. Z tohoto důvodu se jako nejpraktičtější a nejvýhodnější přístup jeví vyhodnocení rozložení biofilmu ze snímků získaných světelnou nebo konfokální laserovou mikroskopií. Mikroskopie pomáhá vytvářet vizuální představu o rozložení biomasy, ale nemusí ji nutně vyčíslit. Rozložení biomasy musí být číselně vyjádřeno tak, aby mohlo být korelováno s aktivitou biofilmu a vnitřními procesy v něm probíhajícími [5, 6, 20].

Velikost shluku a jeho tvar jsou příklady strukturálních znaků biofilmu. Účinnost znaků struktury reprezentujících heterogenitu se zakládá na korelaci změn základních procesů, které vytvořily biofilm a určily jeho chování za známých podmínek. Z výše uvedené skutečnosti je možné se domnívat, že velikost buněčných shluků nebo intersticiálních (prázdných) prostor by mohla být spojována se změnami druhu populace i stavu živin a že tvar shluků buněk by mohl být spojen s hydrodynamikou [20].

Snímky rozložení biomasy v prostoru obsazeném biofilmem se používají k stanovení hodnot parametrů charakterizujících strukturu biofilmu. Tyto parametry však samy o sobě nereflektují všechny základní procesy probíhající v biofilmu. Jsou to hodnoty matematických funkcí charakterizujících rozdělení pixelů ve snímcích biofilmu [6, 20].

2.3.1 Typy snímků

Snímky biofilmu lze pořídit pomocí světelné/elektronové mikroskopie anebo konfokální skenovací laserové mikroskopie (CSLM). Poté co jsou jednotlivé snímky vytvořeny, následuje jejich uložení v patřičném formátu do datového úložiště (pro účely této práce bylo využito ukládání snímků ve formátu JPG velmi malým kompresním poměrem, což bylo pro obrazovou analýzu nezbytné). Barevné RGB snímky jsou následně převedeny do škály šedi, které pak mohou být v případě potřeby převedeny na binární obrazy [6]. Pro hodnocení biofilmové struktury je vhodné využít dvou typů snímků, a sice šedotónové snímky a binární snímky.

Ad 1) Šedotónové snímky

Existuje 256 odstínů (škály) šedé, které vyplývají z použití osmibitového kódování informace na dvou úrovních 0 a 1 ($2^8 = 256$). Pokud byly snímky

biofilmu pořízeny v modelu RGB, každá ze tří barev (červená, zelená, modrá) by měla 256 úrovní a každý pixel proto musí být popsán jedním z $256^3 = 16\,777\,216$ stupňů barev, což by způsobovalo výpočetní obtíže a časovou náročnost související s rozsáhlými soubory dat. Urychlení výpočtů je dosaženo převodem RGB snímků na snímky v odstínech šedi. Každý pixel šedotónového snímku odpovídá celému číslu na stupnici od 0 do 255, které odráží intenzitu světla. Proto lze tyto snímky reprezentovat maticí, kde každý pixel obrazu má hodnotu ve výše uvedeném intervalu [6].

Ad 2) Binární snímky

Každý pixel šedotónového obrazu biofilmu představuje jednu z 256 úrovní na stupnici šedi. Kvantifikovat některé z parametrů charakterizujících strukturu biofilmu lze až poté, co bude každý pixel v šedotónovém obraze přepsán buď na biomasu, nebo na intersticiální (prázdné) místo, tj. intenzita šedé úrovně je zastoupena 1 nebo 0 pro každý pixel obrazu. Za tímto účelem je šedotónový obraz převeden na černobílý obraz segmentací pomocí prahovacího algoritmu. Zpravidla na binárním snímku bílé plochy znázorňují biomasu, zatímco černé vykreslují prázdná místa. V některých případech je vhodnější vizualizovat uskupení buněk barvou černou, protože černá je více vidět. To však není zásadní problém pro výpočty, pokud je známo, jakou barvou jsou vyobrazeny buněčné shluky a které obrazové body jsou přiřazeny prázdným místům [6, 20].

2.3.2 Hodnocení strukturních parametrů snímků biofilmu

Parametry, které popisují strukturu biofilmu, mohou být klasifikovány jako texturní a plošné. Texturní parametry popisují míru heterogenity snímku, plošné parametry popisují morfologické vztahy mezi velikostí orientace a tvarem povrchových znaků [6, 20].

Texturní parametry jsou počítány z šedotónových snímků, oproti tomu plošné parametry jsou vyčísleny z binárních snímků. Převod šedotónových snímků do binárních obrazů je interaktivně realizován výběrem prahové hodnoty, která rozdělí snímek na černé (pozadí) a bílé (biofilm) pixely. Každý snímek je reprezentován maticí, jejíž prvky jsou vyčíslené hodnoty stupně šedi odpovídajících pixelů. Tyto hodnoty jsou následně použity ke kvantifikaci parametrů struktury biofilmu [20].

i) Texturní parametry

Textura je dle literatury [6] definována jako opakující se vzor změn intenzity obrazu a poskytuje tak informace o rozmístění intenzity stupňů tónů šedi v okolí. Texturu je možno rovněž formulovat jako rychlost a směr změn chromatických vlastností obrazu [20]. Subjektivně ji lze popsat jako jemnou, hrubou, hladkou, náhodnou, kuželovitou, nepravidelnou apod. [20].

Texturní parametry kvantifikovaně určí strukturu biofilmu porovnáním velikosti, polohy (pozice) a/nebo orientace vizuálních komponent. Každý texturní parametr měří změny úrovně šedi v buněčných shlucích a v prázdných okolních prostorech na základě pravděpodobnosti toho, že se v okolí budou nacházet pixely stejného nebo podobného typu. Parametry představují míru heterogenity v biofilmu, a to porovnáním velikosti, pozice a orientace složek v biofilmu. Jsou počítány z osmibitových šedotónových snímků, kde každý pixel nabývá hodnoty v intervalu $<0, 255>$ [6, 20].

Pro účely předkládané práce budou kvantifikovány tyto parametry struktury [6]:

- **Texturní entropie (TE)** udává míru náhodnosti stupně šedi v obrazu. Čím vyšší je TE, tím více je různorodější struktura biofilmu. Pro obraz bez struktury složeného pouze z bílých pixelů je hodnota TE rovna nule, prokazuje tedy, že nejsou v obraze žádné rozdíly stupně šedi v pixelech.
- **Energie (E)** je míra směrově se opakujících vzorů pixelů, je citlivá na orientaci shluků pixelů a podobnost jejich tvarů. Menší energetické hodnoty znamenají časté a opakované vzory shluků pixelů, vyšší energie znamená více homogenní strukturu obrazu s menším počtem opakovaných vzorů. V případě čisté plochy se energie rovná jedné, nejsou zde žádné opakující se vzory pixelů.
- **Homogenita (H)** vyjadřuje míru prostorově se opakujících vzorů pixelů. Měří podobnost shluků. Vyšší homogenita značí více homogenní strukturu obrazu. Homogenita je normalizována s ohledem na vzdálenosti mezi změnami struktury, je nezávislá na umístění obrazových shluků pixelů v obraze. Pro snímek bez struktury složeného pouze z bílých pixelů je homogenita rovna jedné. Ukazuje, že nejsou v obraze žádné opakující se prostorové vzorce. Výše homogenity by postupně klesala s rostoucím počtem buněčných shluků.

Definice energie a homogenity jsou podobné, vyjadřují podobnou míru, jsou však normalizované podle směru respektive vzdálenosti. Vyšší hodnoty energie

znamenaí větší směrovou jednotnost v obraze a hodnoty homogenity ukazují větší či menší rozdíly v kontrastu obrazu. Výpočty vycházejí z popisu uvedeného v literatuře [21]. Texturní parametry jsou počítány z hodnot výskytu úrovně šedi v matici GLCM (Gray level co-occurrence matrix). Tato matice obsahuje informace o pozicích pixelů, které mají stejnou hodnotu úrovně šedi. GLCM je sestavena z matic prostorových závislostí v horizontálním a vertikálním směru. Matice horizontální a vertikální prostorové směrové závislosti udávají intenzitu změny v jejich příslušných směrech [6].

Termíny energie a entropie, jsou-li používány v odkazu na obrazy, jsou poněkud matoucí, jelikož dochází k nesprávnému spojení s původně fyzikálními pojmy [6]. Výpočet normalizovaných prostorově závislých matic je uveden na následujícím snímku biofilmu (viz Obr. 3) s rozměry 4×4 a se čtyřmi úrovněmi šedi (0 – 3) [6, 20].

0	0	1	1
1	2	0	1
2	3	1	0
2	2	2	3

Obr. 3: Snímek biofilmu k sestavení matice prostorové závislosti

Horizontální prostorová závislost matice (P_H) tohoto snímku je vyjádřena následujícím vztahem:

$$P_H = \{p_H(a, b)\} = \begin{bmatrix} p_H(0,0) & p_H(0,1) & p_H(0,2) & p_H(0,3) \\ p_H(1,0) & p_H(1,1) & p_H(1,2) & p_H(1,3) \\ p_H(2,0) & p_H(2,1) & p_H(2,2) & p_H(2,3) \\ p_H(3,0) & p_H(3,1) & p_H(3,2) & p_H(3,3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 2 & 3 & 1 & 0 \\ 3 & 2 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 4 & 2 \\ 0 & 1 & 2 & 0 \end{pmatrix}$$

kde $P_H(a, b)$ je počet změn na stupnici šedi mezi $a \rightarrow b$ v horizontálním směru v obraze, a to v obou možných směrech. Například $P_H(0,1)$ je počet změn stupně šedi mezi hodnotou 0 a 1. Jsou zde 2 takové změny ve směru zleva doprava a 1 změna zprava doleva, tedy celkem tři $P_H(0,1) = 3$.

Podobně, vertikální prostorová závislost matice (P_V) je vyčíslena:

$$P_V = \{p_V(a, b)\} = \begin{bmatrix} p_V(0,0) & p_V(0,1) & p_V(0,2) & p_V(0,3) \\ p_V(1,0) & p_V(1,1) & p_V(1,2) & p_V(1,3) \\ p_V(2,0) & p_V(2,1) & p_V(2,2) & p_V(2,3) \\ p_V(3,0) & p_V(3,1) & p_V(3,2) & p_V(3,3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 4 & 1 & 1 \\ 4 & 2 & 2 & 0 \\ 1 & 2 & 2 & 2 \\ 1 & 0 & 2 & 0 \end{pmatrix}$$

kde $P_V(a, b)$ je počet změn na stupnici šedi mezi $\mathbf{a} \rightarrow \mathbf{b}$ v přilehlých svislých místech snímku v obou směrech. Prostorová závislost matice (P_{HV}) je součtem horizontálních a vertikálních prostorových závislostí matice.

$$P_{HV} = P_H + P_V \{p_{HV}(a, b)\} = \begin{pmatrix} 2 & 7 & 2 & 1 \\ 7 & 4 & 3 & 1 \\ 2 & 3 & 6 & 4 \\ 1 & 1 & 4 & 0 \end{pmatrix}$$

$P_{HV}(a, b)$ je celkový počet změn intenzity šedi z $\mathbf{a} \rightarrow \mathbf{b}$ a z $\mathbf{b} \rightarrow \mathbf{a}$ součtem v horizontálním i vertikálním směru. Normalizace je provedena sumou všech elementů a vydělením každého elementu sumou [6]:

$$sum = \sum_a \sum_b P_{HV}(a, b) = 48$$

$$P_N(a, b) = \frac{P_{HV}}{sum} = \begin{pmatrix} 0,0417 & 0,1458 & 0,0417 & 0,0208 \\ 0,1458 & 0,0833 & 0,0625 & 0,0208 \\ 0,0417 & 0,0625 & 0,1250 & 0,0833 \\ 0,0208 & 0,0208 & 0,0833 & 0 \end{pmatrix}$$

Dle normalizované matice prostorové závislosti P_N jsou texturní parametry definovány podle následujících vztahů:

Texturní entropie

$$TE = - \sum_{a,b} \sum_{P_N(a,b) \neq 0} P_N(a, b) \log(P_N(a, b)) \quad (1)$$

Energie

$$E = \sum_a \sum_b (P_N(a, b))^2 \quad (2)$$

Homogenita

$$H = \sum_a \sum_b \frac{1}{1+(a-b)^2} P_N(a, b) \quad (3)$$

ii) Plošné parametry

Plošné parametry popisují morfologii struktury biofilmu. Morfologie se zabývá zejména velikostí, tvarem a orientací základních složek biofilmu. Každý parametr měří jedinečný charakteristický znak plochy buněčného shluku, nebo neobsazených prostor. Z tohoto důvodu je velmi důležité pomocí obrazové analýzy snímku oddělit shluky buněk od prázdných neobsazených prostor. Princip oddělení buněčných shluků a neobsazených prostor spočívá v segmentaci obrazu, která rozděluje snímek do

různých složek. Velmi často využívanou metodou segmentace obrazu je metoda prahování obrazu [6].

2.3.3 *Prahování snímků biofilmu*

Segmentace obrazu je nejzásadnějším krokem v celém postupu vedoucím k analýze obsahu zpracovávaných obrazových dat. Cílem segmentace je rozčlenit obraz do částí majících úzkou souvislost s předmětem zájmu, který je zachycen na snímcích [22].

Prahování je jednou z nejstarších segmentačních metod, která komprimuje barevnou škálu obrazu typicky na dvě barvy. Snímky biofilmu snižuje prahování z 256 úrovní šedi na dvě, které oddělí obraz na biomasu a neobsazený prostor, resp. pozadí a nosič. Prahování je subjektivní operace založená na snaze najít hodnotu prahu z 256 stupňů šedi, která bude nejlépe reflektovat rozdíl mezi biomasou a volným prostorem [6, 11, 22].

Dosažení statisticky objektivních morfologických parametrů ze snímků biofilmu, je závislé na opakování postupu prahování. Volba prahu je subjektivní, závisí tedy na pozorovateli, porozumění obsahu obrazu a také na požadovaném vztahu mezi oběma segmenty výsledné segmentace konečného obrazu. Variabilita mezi pozorovateli při výběru prahu negativně ovlivňuje měření získané z binárního obrazu, tzn., že ze stejných snímků jsou získány odlišné výsledky. Protože neexistuje žádná správná absolutní hodnota prahu, předpokládá se, že přijatelné je automatické prahování. Automatické prahování je metoda, která určí hodnotu prahu, která se blíží průměrné hodnotě stanovené skupinou odborníků. Předpokládá se, že automatické řízení, které má dostatečnou přesnost, by mohlo přinést více reprodukovatelných výsledků než v případě lidských pozorovatelů. Pro hodnocení účinnosti vybraných automatických postupů prahování obrazu je nezbytné vyzkoušet variabilitu (odchylka od normálu) prahových hodnot stanovených ručně různými pozorovateli, variabilitu hodnot stanovených automaticky pomocí známých algoritmů prahování a kompromis mezi limity nastavenými ručně a pravidly stanovenými automaticky [6].

2.3.4 *Plošná porozita AP*

Plošná porozita je definována jako poměr prázdné plochy k ploše celkové. AP z binární matice snímku biofilmu je definována následujícím vzorcem [6]:

$$AP = \frac{\text{Počet prázdných pixelů}}{\text{Celkový počet pixelů}} \quad (4)$$

Příklad výpočtu plošné porozity je uveden na Obr. 4:

0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0
0	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Obr. 4: Binární snímek použitý pro ukázkový výpočet AP

Z výše uvedeného Obr. 4 je patrné, že počet prázdných pixelů je 27, celkový počet pixelů je 36, tudíž je $AP = 27/36 = 0,75$. Plošná porozita může být vyjádřena také procentuálně, tj. AP tohoto snímku je 75 %.

2.3.5 Průměrná délka běhu ARL

Průměrná délka běhu (ARL) reflektuje průměrný počet pixelů (s hodnotou 1) biomasy představující shluky buněk, které se ve snímku nacházejí nepřetržitě za sebou. Průměrné délky běhu měří očekávaný rozměr buněčného shluku v každém směru, a proto jsou měřítkem velikosti shluku [6, 20].

0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Obr. 5: Horizontální a vertikální délky běhu

Průměrné horizontální a vertikální délky běhu jsou vypočteny jako poměr celkového počtu pixelů k celkovému počtu běhů v každém směru. Binární snímek na

Obr. 5 má průměrnou horizontální délku běhu $AHRL = (5+5+5+1)/4 = 16/4 = 4$ (pixely) a průměrnou vertikální délku běhu $AVRL = (3+3+4+3+3)/5 = 16/5 = 3,2$ (pixelů).

2.3.6 *Difuzní vzdálenost DD*

Difuzní vzdálenost (DD) lze definovat jako minimální vzdálenost pixelu ve shluku k nejbližšímu prázdnému pixelu ve snímku. V praxi jsou kvantifikovány dva typy difuzních vzdáleností, a sice průměrná a maximální. Průměrná difuzní vzdálenost (ADD) se vztahuje na všechny shluky pixelů v obraze. Je vyčíslena jako průměr difuzních vzdáleností od každého pixelu ve shluku do nejbližšího prázdného pixelu ve snímku. Větší difuzní vzdálenost signalizuje pro substrát větší vzdálenost, kterou musí urazit v buněčném shluku. Maximální difuzní vzdálenost (MDD) je definována jako vzdálenost od nejvíce vzdáleného pixelu v buněčném shluku k nejbližšímu prázdnému shluku [6, 22].

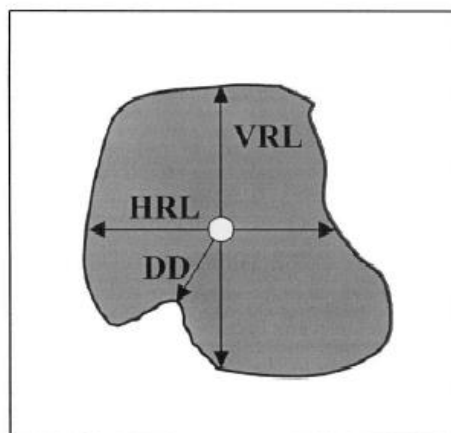
Výpočet ADD se provádí pomocí euklidovské vzdálenosti, a to dle následujícího vztahu – rovnice 5:

$$D_E = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (5)$$

Pro binární snímek biofilmu $M \times N$ (viz Obr. 6) je (i, j) prvek (pixel) snímku. $|P(i, j)|$ je difuzní vzdálenost pro tento pixel. $|P(i, j)|$ je vypočtena jako euklidovská vzdálenost pixelu ve shluku ke svému nejbližšímu prázdnému pixelu [11].

$$P(i,j) = (P_i, P_j) \quad 0 \leq i \leq M-1, \quad 0 \leq j \leq N-1$$

$$|P(i,j)| = \sqrt{P_i^2 + P_j^2}$$



Obr. 6: Schéma buněčného shluku (HRL – horizontální délka běhu, VRL – vertikální délka běhu, DD – difuzní vzdálenost) [20]

Difuzní vzdálenost slouží k měření vzdálenosti živin od buňky. Příklad výpočtu difuzní vzdálenosti DD pomocí euklidovské vzdálenosti je uveden níže na Obr. 7.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
0	1	1	1	1	0	0	0	1,41	1,41	1	0
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) b)

Obr. 7: Výpočet euklidovské vzdálenosti (b) z původního snímku (a)

Z mapy euklidovských vzdáleností (viz Obr. 7) je $ADD = (1+1+1+1,41+1,41+1+1+1)/8 = 8,82/8 = 1,1$ (pixelů) a MDD je rovna 1,41 [6].

2.3.7 Obvod (hranice)

Obvod je definován jako celkový počet pixelů nacházejících se na hranici buňky či shluku buněk, tudíž se počítají pouze pixely v kontaktu s intersticiálním prostorem. Stanovení obvodu lze uskutečnit odečtením snímku zmenšeného o jednu vrstvu od původního binárního snímku (binární eroze) [5, 6].

0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0
0	1	1	1	1	0
0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0

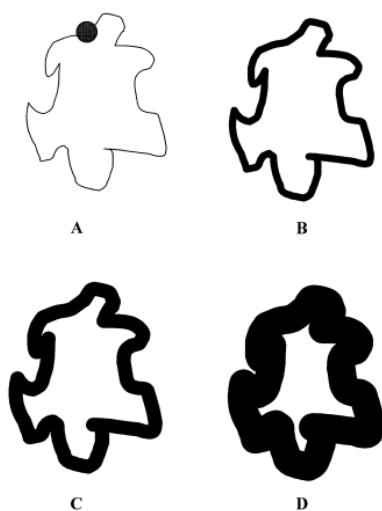
Obr. 8: Obvod (hranice)

Obvod na Obr. 8 je kvantifikován následovně: $1+1+1+1+1+1 = 6$. Šedé pixely značí hranice buněčného shluku a celkový počet těchto pixelů tvoří obvod [6].

2.3.8 Fraktální dimenze FD

Ve 2D prostoru měří fraktální geometrie míru nepravidelnosti (nerovnoměrnosti) obvodu objektu, nabývá hodnot v intervalu (1, 2). Čím je vyšší hodnota fraktální dimenze, tím více je nepravidelný obvod objektu. Pro účely obrazové analýzy je zřejmé, že čím více jsou nepravidelné hranice biofilmu, tím vyšší je fraktální dimenze [6].

Jedna z metod výpočtu fraktální dimenze v obrazové analýze, často užívaná v praxi, je Minkowského metoda. Tato metoda je založena na myšlence stanovení míry změny v obvodu objektu tím, jak se zvyšuje tloušťka obvodové hranice. Postupným opakováním se dlouhé a velmi nepravidelné hranice stávají stále kratší. Nesrovnalosti se vyhlazují při použití silnější obvodové linky. Z hlediska zpracování obrazu se tento postup nazývá dilatace (nepřetržitě pohybující se kruh kolem obvodových hranic objektu, viz Obr. 9) používaný k dosažení vyhlazení hraniční linie. Každý kruh určitého poloměru se pohybuje po obvodu objektu a produkuje tak nový obvod [6].



Obr. 9: Dilatace objektu o různých poloměrech dilatačních kruhů [20]

První krok výpočtu obvodu spočívá v nastavení hodnot pixelů hranice na hodnotu 0 a zbylých pixelů na hodnotu 1. Poté následuje výpočet euklidovské vzdálenosti, tím bude kvantifikována vzdálenost každého pixelu k hranici [6, 20].

Výběrem poloměru dilatačního kruhu a stanovením počtu pixelů, které jsou menší než tento poloměr, vzniká oblast dilatace. Tedy obvod je spočten dle vztahu [6]:

$$Obvod = \frac{Dilatační\ plocha}{Průměr\ dilatačního\ kruhu} \quad (6)$$

Vynesením bodů získaných kvantifikací logaritmu průměrů dilatačních kruhů vzhledem k logaritmu naměřených obvodů objektu lze sestavit přímku. Fraktální dimenze je následně stanovena vztahem:

$$FD = 1 - sklon\ přímký \quad (7)$$

2.3.9 Rušivé vlivy metod obrazové analýzy na kvantifikaci parametrů

Kvantifikace struktury biofilmu, resp. parametrů, které charakterizují strukturu biofilmu, je ovlivněna postupy používanými k získání snímků a metodami, které byly použity ke kvantifikaci dílčích parametrů. Na tyto postupy/metody působí různé nežádoucí vlivy, které jsou obtížně kontrolovatelné. V následujícím textu je uvedeno několik těchto vlivů.

i) Vliv orientace a reverze barev snímku

Texturní parametry odrážejí rozložení intenzity stupně šedi a je důležité určit, zda jsou ovlivněny orientací snímku. Podle důkazu v souladu s literárním zdrojem [6] nejsou texturní parametry (texturní entropie, energie, homogenita) závislé na poloze, otočení snímku o určitý úhel, barevné reverzi vzhledem k původnímu snímku nebo na použité mikroskopické technice. Hodnoty texturní entropie, energie i homogenity jsou tak u všech těchto snímků biofilmu shodné. Tato skutečnost je důležitá, protože jednoduché manipulace se snímky jsou běžné u obrazové analýzy biofilmu.

Texturní parametry nemusí poskytovat užitečné informace o vlivu průtoku kapaliny na shluky buněk. Buněčné shluky se v prostředí s vysokými průtoky, resp. s vysokými stříhovými silami stávají podlouhlými, ale z texturních parametrů lze pouze detekovat opakující se šedotónové vzory, které nejsou výrazně ovlivněny prodloužením. Tyto vlivy jsou kvantifikovány pomocí plošných parametrů. Otáčení snímku mění pouze hodnoty AHRL a AVRL. Reverze snímku na druhou stranu ovlivňuje všechny

plošné parametry, protože jsou nahrazena prázdná místa s buněčnými shluky a naopak [6].

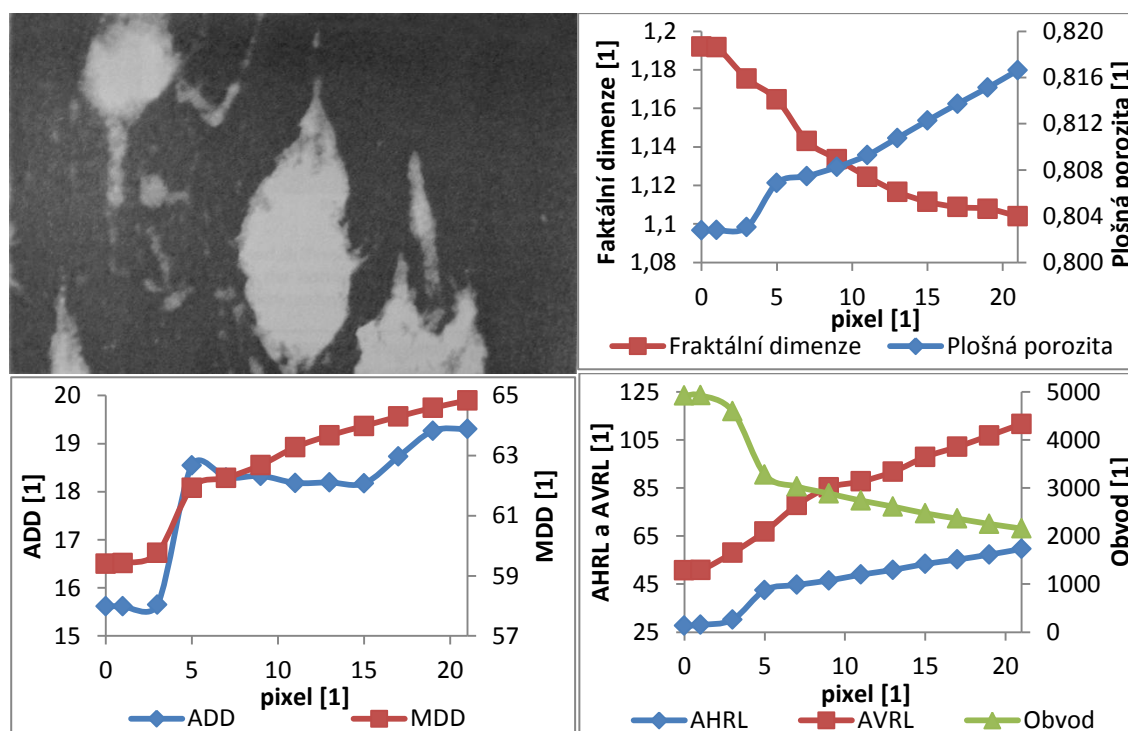
ii) Vliv filtrování obrazu

K vytvoření digitálně filtrovaného snímku je zapotřebí modifikace jednotlivých obrazových bodů na základě vlastností okolních pixelů. Modifikace je běžná procedura, která je spjatá s obrazovou analýzou snímku, a proto je vhodné se zabývat možnými dopady na vypočtené plošné a texturní parametry [6].

Nelineární operací, často využívanou ve zpracování obrazu, je metoda mediánového filtrování, která se používá ke snížení šumu v obraze. Na rozostřený snímek je aplikován mediánový filtr, který setřídí šedotónové hodnoty pixelů v okolí zpracovávaného pixelu podle velikosti a následně zvolí medián, který se stává novou hodnotou zpracovávaného pixelu [6, 23].

Vliv filtrování obrazu na plošné parametry

Cílem této kapitoly je přiblížit možné dopady mediánového filtrování na plošné parametry charakterizující snímky biofilmu. Podle literatury [6] jsou po aplikaci mediánového filtru ovlivněny všechny plošné parametry, i když v různé míře. Binární snímky byly filtrovány pomocí mediánových filtrů o velikosti $[x, x]$ pixelu. Snímky byly filtrované po prahování. S rostoucí velikostí mediánového filtru klesají hodnoty parametrů fraktální dimenze a obvodu (hranice) biofilmu, naopak rostou hodnoty plošné porozity, průměrné difuzní vzdálenosti ADD i maximální MDD a průměrné horizontální/vertikální délky běhu.



Obr. 10: Vliv mediánového filtrování obrazu na hodnocené parametry

Vliv filtrování obrazu na texturní parametry

Mediánový filtr $[x, x]$ výrazně ovlivňuje vypočítané texturní parametry. Energie se zvyšuje logaritmicky při použití filtru, který je v průměru větší než jeden pixel. Jakýkoliv filtr s velikostí větší než jeden pixel bude mít určitý vliv na texturní parametry. Tuto skutečnost je třeba vzít v úvahu při výběru rozsahu filtrace, a to zejména proto, že neexistují algoritmy, které jednoznačně stanoví správnou velikost filtrace šedotónových snímků, vlivy filtrace jsou odlišné na různých snímcích. Je velmi důležité znát typ a velikost filtru, který byl použit k manipulaci se snímkem před tím, než budou počítány texturní parametry [6].

Vliv ostrosti obrazu (ohniskové vzdálenosti)

Další důležitou otázkou, která je často kladená ze strany výzkumných pracovníků, kteří analyzují snímky biofilmu, je, zda zaostření snímku ovlivňuje vypočtené parametry. Chceme-li kvantifikovat vliv ohniskové vzdálenosti, musíme zaostřit objektiv na spodní část biofilmu a získat tak co nejlepší zaostření (ohnisko) [6].

Snížení kvality snímku je docíleno změnou ohniskové vzdálenosti např. o 100 a 200 μm pod optimálním ohniskem (na dně biofilmu) nebo taktéž 100 a 200 μm nad optimem. Plošné parametry se podle očekávání liší, udávají maxima nebo minima hodnot parametrů v ideální ohniskové vzdálenosti. Nicméně, texturní entropie

a homogenita se liší náhodně. Mezi těmito různě zaostřenými snímky je minimální vizuální rozdíl, avšak vypočtené parametry jsou odlišné, ukazují, že kvalita obrazu je důležitá a ovlivňuje tak vypočtené parametry. Jestliže budou snímky pořízeny na stejném místě v biofilmu, ale každý snímek bude zaostřen v jiné ohniskové vzdálenosti, vypočtené parametry budou různé [6].

Vliv zvětšení snímku

Ke kvantifikaci vlivu zvětšení snímků na vypočtené parametry byly v rámci literatury [6] pořízeny snímky stejného místa biofilmu při 100 násobném a 40 násobném zvětšení. Přirozeně se se zvětšením mění i oblast pokrytí snímku biofilmu. K vyhodnocení vlivu zvětšení bylo zhotoveno 20 snímků na náhodně vybraných místech stejného biofilmu pomocí zvětšení 100/40 násobném a následně byly vypočteny plošné a texturní parametry. Výsledky ukazují, že obrazové zvětšení ovlivní pouze některé parametry. Ke kvantifikaci vlivu zvětšení obrazu je využit poměr ($R = 100x/40x$), kdy je nejprve vyčíslena hodnota parametru při 100 násobném zvětšení, a poté při 40 násobném. V případech, kdy obrazové zvětšení není zásadní, je R rovno 1 [6].

Pro AP a TE se R blíží k jedné, což dokazuje, že tyto parametry nejsou výrazně ovlivněny zvětšením. R je o něco nižší u FD, MDD a AHRL a AVRL, P, E a H, což ukazuje, že tyto parametry jsou mírně ovlivněny zvětšením. Průměrná difuzní vzdálenost ADD je nejvíce ovlivněný parametr s $R = 3,24$ [6].

Závěrem lze konstatovat, že při porovnávání snímků z různých biofilmů je zásadní použít stejné zvětšení [6].

3 PRAKTICKÁ ČÁST

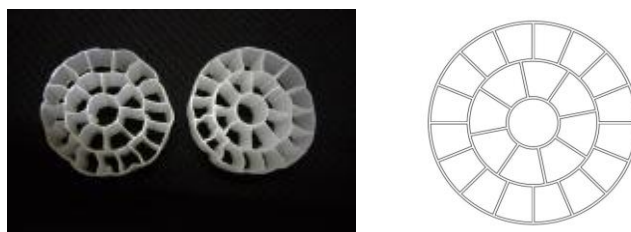
3.1 POPIS POUŽITÝCH NOSIČŮ BIOFILMU

Prvním typem nosiče, který byl testován v rámci této diplomové práce, byl komerčně dodávaný nosič biofilmu AnoxKaldnes K3. Fotografie těchto nosičů je uvedena na Obr. 11. Zde jsou vidět jak nové (bílé), tak i použité (hnědé) nosiče biomasy.



Obr. 11: Fotografie testovaného komerčního typu nosiče biofilmu AnoxKaldnes K3 [17]

Další typem nosiče biofilmu, který byl v rámci této diplomové práce testován, byl nosič s komerčním názvem PAQ_34. Tento nosič byl vyvinut společností PRO-AQUA CZ, s.r.o., která se zaměřuje na realizaci projektů v oblasti vodního hospodářství (čištění odpadních vod, úprava vod pitných apod.). Nosič biofilmu PAQ_34 je navržen pro univerzální využití pro pomalu i rychle rostoucí mikroorganismy, tedy typy biodegradérů s nízkým i vysokým koeficientem produkce biomasy. Proto vykazuje relativně značný povrch při vysoké průchodnosti kapaliny nosičem, což zabraňuje problémům s ucpáváním otvorů nosiče biofilmem a snižováním celkového užitého specifického povrchu. Na druhou stranu je specifický povrch nosiče dostatečný pro fixaci pomalu rostoucích mikroorganismů s nižší hodnotou koeficientu produkce biomasy, např. nitrifikační bakterie. Fotografie a schematický náčrtek příčného průřezu tohoto testovaného nosiče biofilmu je uvedena na Obr. 12.



Obr. 12: Druhý testovaný typ nosiče biofilmu PAQ_34 [17]

Poslední testovaný nosič biofilmu (Obr. 13)) představovala pletenina z příze s nanovlákněným povrchem, která byla vyvinuta v laboratořích Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace TUL.



Obr. 13: Pletenina z příze s nanovlákněným povrchem

3.2 BAKTERIÁLNÍ KULTURA

Pro účely předkládané diplomové práce byla pro inokulaci provozovaných modelů použita populace bakterie rodu *Rhodococcus erythropolis*. Tento bakteriální kmen krom toho, že je schopen adheze buněk k pevnému nosiči a vytvářet tak biofilmové struktury, disponuje také širokým degradačním potenciálem, využívá i obtížně odbouratelné sloučeniny a v neposlední řadě vyniká svou odolností a schopností přizpůsobit se velkým změnám teploty i vysoké salinitě. Inokulační médium tohoto bakteriálního kmene bylo připraveno na Ústavu biotechnologie VŠCHT Praha. Inokulační médium bylo postupně adaptováno na vysoké koncentrace fenolu, čímž byla umožněna jeho efektivní biodegradace, a na toxické organické látky, které vznikají jako odpadní produkty některých průmyslových výrob, např. kresoly, dimethylfenoly aj. [5, 13].

3.3 PROVOZ A MONITORING LABORATORNÍCH BIOREAKTORŮ

K experimentální kultivaci mikrobiální vázané populace (testování bakteriálního kmene schopného degradace fenolu) a k jejímu následnému hodnocení byly v laboratoři TUL sestaveny dva laboratorní modely bioreaktorů. Detailnější popisy bioreaktorů jsou uvedeny dále.

3.3.1 Laboratorní experiment 1

První laboratorní experiment byl zkonstruován ze čtyř bioreaktorů, viz následující Obr. 14.



Obr. 14: Laboratorní experiment 1 provozovaný v rámci této diplomové práce

Kontinuálně protékané bioreaktory tvořily plastové nádoby o objemu 1 l, do kterých byly umístěny 3 typy nosičů – nanovláknenný, který tvořila nit s nanovláknenným povrchem „namotaná“ na mikroskopickém sklu, dále komerční nosič AnoxKaldnes K3 a nosič PAQ_34. Nosiče AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 se volně pohybovaly v reaktoru, jinými slovy řečeno, nebyly nijak fixovány. Reaktory byly naplněny médiem (odstátou vodovodní vodou a bakteriální populací adaptovanou na vysoké koncentrace fenolu a soli) do objemu cca 700 ml. Jelikož cílem bylo sledovat vliv solnosti na tvorbu biofilmu a na jeho strukturu, byly jednotlivé reaktory provozovány při rozdílných koncentracích chloridu sodného. Salinita odpovídající měrné vodivosti média v prvním bioreaktoru byla přibližně $10 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, v druhém bioreaktoru $20 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, v třetím $40 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ a ve čtvrtém $60 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Jediný zdroj uhlíku pro mikroorganismy v modelové odpadní vodě představoval fenol o koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Modelová odpadní voda dále obsahovala živiny ve formě fosfátů K_2HPO_4 (koncentrace $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a amoniakální soli NH_4Cl (koncentrace $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Přítok odpadní vody do bioreaktorů byl zajištěn pomocí čtyřkanálového peristaltického dávkovacího čerpadla Watson Marlow s konstantním průtokem 70 ml za den. Odtok z bioreaktorů byl realizován prostřednictvím přepadu a následně odveden pryč, čímž byl zároveň zajištěn konstantní objem v reaktorech.

Použitý kmen bakteriální populace *Rhodococcus erythropolis* vyžadoval neustálý přísun kyslíku, který byl v reaktorech zajištěn provzdušňovacím zařízením s jemnobublinným aeračním elementem.

Provoz a monitoring bioreaktorů, potažmo doba kultivace mikroorganismů, trval 6 týdnů. Doba zdržení, která je definována dle literatury [24] jako objem reaktoru vztažený k průtoku odpadní vody, byla stanovena na 10 dní, tzn., že za období deseti dní při přítoku $70 \text{ ml} \cdot \text{d}^{-1}$ bylo kompletně vyměněno médium v bioreaktorech. Pro nízké hodnoty doby zdržení je charakteristický pokles biomasy v reaktorech v důsledku vyplavování (velký přítok). Naopak vysoká doba zdržení zapříčiňuje malé množství živin s následkem pomalého růstu bakteriální populace. Transport dostatečného množství živných látek v sestavených bioreaktorech byl zajištěn konstantním přítokem, resp. konstantním přívodem substrátu [5, 24].

3.3.2 Laboratorní experiment 2

Druhý experiment byl složen celkem z 18 plastových laboratorních zkumavek bez nucené aerace a obsahujících kapalná média s různou mírou salinity, resp. měrné vodivosti, a to 10, 40, $90 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$. Plastová víčka byla nahrazena buničitou vatou Pehazell, díky čemuž byl umožněn transport kyslíku k nasazené mikrobiální populaci, a to skrze difundaci přes hladinu. Jednotlivé zkumavky naplněné médiem byly umístěny do třepačky, která vykonávala horizontální kruhový pohyb, a tím zajišťovala míchání (viz Obr. 15). Samotné médium dávkované do zkumavek s různou salinitou bylo odebíráno z kontinuálně provozovaných reaktorů za aerobních podmínek. Médium tvořila bakteriální populace adaptovaná na vysoké dávky fenolu a solnost, dále pak fenol o koncentraci $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a živné médium ($60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ a $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$). Dvakrát týdně po dobu kultivace (tj. 43 dnů) bylo médium měněno v každé z dílčích zkumavek.



Obr. 15: Zkumavky s nosiči biofilmu umístěné na třepačce

Hlavním cílem realizace dvou laboratorních experimentů bylo porovnání charakteru struktury biofilmu při existenci střížných sil laboratorního experimentu 1 a při jejich absenci v případě laboratorního experimentu 2. Účelem těchto experimentů bylo pozorovat jednak vliv solnosti na stav a chování biofilmu, ale také vliv hydrodynamických sil.

3.3.3 *Měřené veličiny*

K optimální kultivaci mikroorganismů je nutné stanovit specifické faktory, které mají vliv na charakter růstu bakteriálního biofilmu nebo udržení buněčné kultury. Experimentální laboratorní modely, v případě reálného využití, je třeba identifikovat, tj. určit hodnoty kultivačních konstant a parametrů. Jedná se o následující možné ukazatele, které určují kvalitativní i kvantitativní výsledky bioprocésů.

i) Hodnota pH

Hodnota pH je charakteristickým ukazatelem kyselosti/zásaditosti kapalného média a je jednou z nejdůležitějších chemických veličin vůbec. Hodnota pH je dle [25] definována jako záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů (tj. součin jejich koncentrace a aktivitního koeficientu) představující míru kyselosti nebo zásaditosti měřené kapaliny. Stanovení hodnot pH v průběhu kultivace bioreaktorů bylo realizováno kombinovanou skleněnou elektrodou, která byla připojena k víceparametrovému měřicímu přístroji WTW Multi 350i.

ii) Elektrická měrná vodivost (konduktivita)

Elektrická měrná vodivost či též konduktivita je základní veličinou udávající informaci o celkovém obsahu solí, kyselin a zásad rozkládajících se disociací v kapalném médiu na elektricky nabitě ionty. Stanovení vodivosti je založeno na metodě měření elektrochemického odporu kapalného média při dané teplotě (vodivost lze matematicky popsat jako převrácenou hodnotu odporu). Přístroje k určení vodivosti měří odpor kapaliny mezi elektrodami vodivostní sondy umístěné v ochranném plastovém pouzdře, která je ponořena do daného kapalného média. Tato sonda následně vyhodnocuje odpor protékající kapaliny. Základní jednotkou vodivosti je $S \cdot m^{-1}$, přičemž v praxi je nejčastěji používanou jednotkou $\mu S \cdot m^{-1}$ nebo $mS \cdot m^{-1}$ [26, 27].

iii) Teplota

Další měřenou veličinou, která má zásadní vliv na růst biofilmu, je teplota. Tato veličina byla měřena také z důvodu závislosti mezi hodnotou pH a teplotou. Pro možnost srovnání naměřených hodnot pH bylo nutné provádět teplotní korekce na příslušnou teplotu. Sondy na měření elektrické měrné vodivosti, resp. měřící zařízení provádělo teplotní korekce již automaticky.

iv) Absorbance (optická hustota)

Posledním laboratorně měřeným parametrem bioreaktorů v rámci této diplomové práce byla absorbance, resp. optická denzita. Absorbance udává množství světla pohlceného měřeným vzorkem. Hodnoty optické denzity reflektovaly růst mikroorganismů tekutého média a stav bakteriálního růstu. Měření zákalu, které odráželo počet buněk v médiu, bylo prováděno prostřednictvím spektrofotometru DR-2800 od firmy Hach-Lange při vlnové délce 420 nm. Měření probíhalo v otevřeném kyvetovém prostoru ve standardní skleněné spektrofotometrické kyvetě o rozměrech 10x10x45 mm.

3.3.4 Tvorba snímků vázané populace (biofilmu)

Snímky zachycující strukturu biofilmu na jednotlivých nosičích byly pořízeny v laboratoři TUL digitálním fotoaparátem Olympus E-510, který byl součástí mikroskopu Olympus BX51M.

Digitální fotoaparát Olympus E-510 patří mezi „zrcadlovky“ s rozlišením 10 milionů efektivních pixelů, s živým náhledem na „antisluneční“ LCD obrazovku s úhlopříčkou 6,4 cm. Byl vybaven 4/3' Live MOS snímačem, který je mechanicky stabilizovaný. Součástí Olympus E-510 byl také inovovaný obrazový procesor umožňující realističtější reprodukci barev a kvalitnější redukci šumu. Fotoaparát Olympus E-510 disponoval rovněž třemi způsoby zaostření objektu či šesti expozičními režimy. Pro účely snímkování byl z těchto expozičních režimů použit tzv. poloautomatický (programová automatika) režim „P“, ve kterém jsou nastaveny hodnoty clony a expoziční časy fotoaparátu podle jasu předmětu [28, 29].

Optický polarizační mikroskop BX51M používaný v rámci této práce byl vybaven optikou UIS s mezizobrazením v nekonečnu a osvětlovacím tělesem pro odražené světlo (BX-RLA2). Toto osvětlovací těleso umožňuje pozorování odraženého světla ve světlém i tmavém poli a v polarizovaném světle. Hlavní výhodou mikroskopu BX51M je velká optika s velkým zorným polem a jeho snadná ovladatelnost. Zvětšení mikroskopu je 50, 100, 200, 500 a 1000 násobné dle zvoleného objektivu (5, 10, 20, 50 a 100x) umístěného v revolverové hlavě [5, 30, 31].

V současné době se již na optickém mikroskopu nepozorují objekty výhradně přes okuláry, ale obraz je zaznamenáván přes fotoaparát nebo kameru přímo na obrazovku počítače pomocí vhodného softwaru. Velkou předností je například možnost rychlého ukládání velkého množství snímků a v případě časového snímkování je z nich poté možné složit video. V této práci bylo využito programu QuickPHOTO MICRO 2.3.

Program QuickPHOTO MICRO 2.3 slouží k záznamu digitálního obrazu především z mikroskopů vybavených digitálními fotoaparáty nebo videokamerami. Dále je určen k úpravě pořízených snímků a měření s následným ukládáním. Živý obraz přenesený z mikroskopu na monitor počítače usnadňuje ostření a správné exponování snímku. QuickPHOTO MICRO 2.3 umožňuje přímé ovládání funkcí fotoaparátu, jako je: kvalita snímku, citlivost, vyvážení bílé barvy, režim blesku, manuální ostření apod. Dále je vybaven měřicími funkcemi (měření délek, obvodů, ploch, úhlů, počítání objektů, aj.) nebo funkcí korekce stínů pro odstranění nedostatků, které jsou způsobeny nerovnoměrným osvětlením [32, 33].

Deep Focus 3.1 je přídatný softwarový modul programu QuickPHOTO MICRO, který je určený k vytváření digitálních snímků s extrémně velkou hloubkou ostrosti, než jaké lze dosáhnout běžnými optickými mikroskopy. Vysokých hloubek

ostrosti je docíleno efektivním skládacím algoritmem. Prvním krokem algoritmu je nasnímání „řezů“ určených ke složení. Nejprve jsou nasnímány jednotlivé snímky objektu s různou rovinou zaostření a se standardní hloubkou ostrosti (tzv. „řezy“), přičemž na každém z dílčích snímků je ostrá jiná část objektu. Tento modul následně v každém z řezů vybere ostrou oblast. Z jednotlivých oblastí ostrosti je složen finální proostřený snímek [34]. Průběh procesu skládání snímků je vysoce výpočtově a časově náročný, přičemž průměrná doba potřebná ke složení finálního snímku z 20 fotografií činila cca 10 minut.

3.4 OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMU

Metoda analýzy mikroskopických obrazů patří mezi metody, které umožňují převést informace obsažené v obraze (tzv. obrazové vjemy) do numerické formy a u kterých nedochází při hodnocení struktury biofilmu k poškození vzorku biofilmu, popř. nosiče. Tato skutečnost reflektuje neinvazivní charakter obrazové analýzy, než jak je tomu u standardně užívaných metod, jako je například stanovení sušiny na nosiči. Velkým pozitivem automatické obrazové analýzy je bezesporu její objektivita při hodnocení, díky větší dostupnosti digitální zobrazovací techniky i rychlost a efektivita při zpracování objemného souboru dat, umožňuje také několikanásobné hodnocení stejného vzorku. Nevýhodou této metody může být naopak nutnost existence odpovídajícího počítačového vybavení [35].

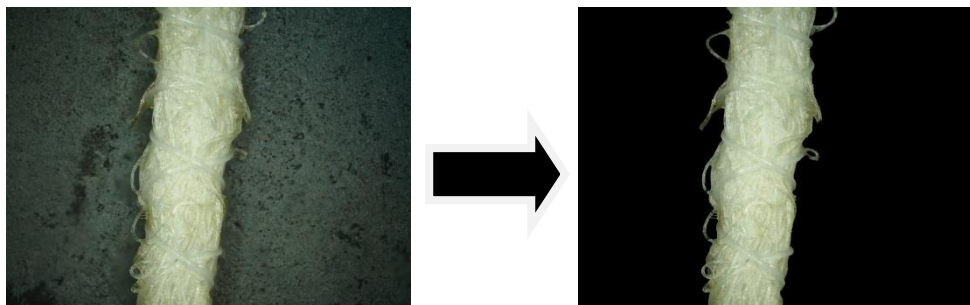
Kvantifikace parametrů charakterizujících strukturu bakteriálního biofilmu na základě pořízených mikroskopických snímků může zahrnovat více metod z oblasti zpracování obrazu. Jedná se například o metody upravující histogram, metody detekující objekty v obraze, metody založené na filtrování obrazu apod. Mimo jiné lze pro každou z výše uvedených metod využít odlišných vyhodnocovacích postupů, přičemž úspěšnost vyhodnocení je často závislá na nastavení interních parametrů. Číselné vyjádření těchto vnitřních parametrů je závislé na aplikaci, především na parametrech pořízení snímků. Významný vliv na kvalitu snímků má samotné nastavení parametrů snímacích zařízení (přiblížení mikroskopu, rovnoměrné nasvícení vzorku, typ zdroje osvětlení, kvalita snímacího zařízení atd.). Korektnost získaných dat pomocí obrazové analýzy závisí zejména na jejím správném kvantitativním/kvalitativním vyjádření, které může být v mnoha případech problematické. Z těchto důvodů je nutné provést dostatečné množství testů na různých sadách zkušebních snímků bakteriálního

biofilmu v průběhu kultivace mikroorganismů. Korektnost obrazové analýzy představuje úspěšný předpoklad možnosti užití analýzy k vyhodnocení kinetiky růstu biofilmu na odlišných typech nosičů, v tomto případě nosiče nanovláknenného, AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 [5, 36].

3.4.1 Digitalizace, předzpracování snímků

Prvním krokem a základním předpokladem pro aplikaci obrazové analýzy je převedení snímku do digitální podoby, tzv. digitalizací. Cílem je zachytit analogový obraz s diskretizací souřadnic obrazu (rozčlenění obrazu na matici o $M \times N$ bodech – prostorové rozlišení) a diskretizací jasových úrovní (jas je spojitou funkcí obrazu – jasové rozlišení). Tyto body se označují jako obrazové pixely.

Druhým krokem je předzpracování obrazu, který má obraz upravit do podoby vhodné pro účel dané analýzy. Důležité je si uvědomit, k čemu bude snímek použit a k tomuto účelu směřovat jednotlivé kroky. Na snímcích, které odrážejí výsledek digitalizace obrazu po mikroskopickém nasnímání, se ve většině případů vyskytují určité deformace z důvodu nízké kvality snímacího zařízení, prostorových deformací apod. Cílem předzpracování je tedy zlepšení obrazu s ohledem na jeho další zpracování, tzn. potlačení šumu v obraze, odstranění zkreslení, potlačení či zvýraznění rysů v obraze. Mnohé operace spojené s počátečním zpracováním obrazu je možné výrazně zjednodušit vhodným nastavením fotografické scény, potažmo mikroskopu, výběrem vhodného objektivu apod. [37]. Vstupem i výstupem procesu předzpracování snímků je diskrétní obraz. Na následujícím Obr. 16 je jako příklad předzpracování snímků zobrazeno vyhlazení nečistot na pozadí nanovláknenného nosiče pro zamezení nesprávné identifikace biofilmu.



Obr. 16: Vyhlazení nečistot na pozadí nanovláknenného nosiče

Po vyhlazení nečistot na pozadí nanovláknenných nosičů byly snímky biofilmu všech nosičů použité pro obrazovou analýzu dále upravovány v grafickém programu

Photoshop pomocí již sestavených maker. Makra jsou programové postupy integrované ve Photoshopu, které byly vytvořeny za účelem urychlení často opakovaných operací s cílem ušetření času předzpracování více snímků (celý adresář).

Před samotnou segmentací objektů biofilmu byly využity tyto operace:

- ostření obrazu;
- korekce jasu a kontrastu;
- úprava histogramu barev a vyvážení bílé.

Účelem těchto úprav bylo zvýšení spolehlivosti detekce shluků biofilmu v obraze. Zejména funkce korekce jasu a kontrastu napomohly k rychlejší a přesnější identifikaci jednotlivých objektů na snímcích.

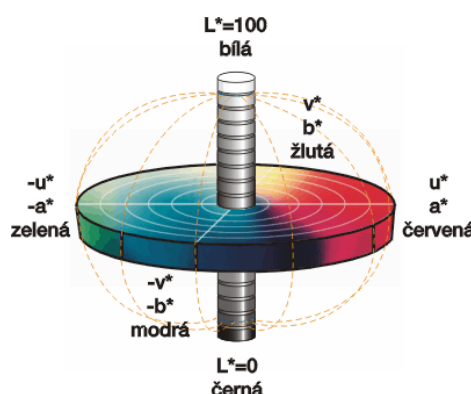
3.4.2 Transformace barev, převod RGB snímků do jiného barevného prostoru

Barvy v diskrétně definovaném obraze jsou reprezentovány pomocí několika barevných prostorů/modelů, které nahrazují spektrum světla viditelné pro lidské oko o vlnových délkách 380 až 750 nm. V případě barevných snímků existuje celá řada dalších možností pro zpřesnění přenášené informace, a to například rozdělit snímek na dílčí složky a pracovat s každou ze složek zvlášť, zvolit nejvýznamnějších z nich nebo nalézt komplexní řešení ve všech složkách apod. Další možnou operací při obrazové analýze je transformace barev na jiný/vhodnější barevný formát, ve kterém vynikne požadovaný charakter informace.

Transformace barev se využívá z důvodu rozdílných interpretací barev rozdílných zařízení, kdy každá transformace je odlišná v závislosti na zařízeních, mezi kterými došlo k přenosu [38]. Barevné prostory lze rozčlenit na prostory závislé (př. RGB) na vlastnostech zařízení a prostory nezávislé (př. CIELAB). Souřadnice prostoru závislého na zařízení podávají informaci, jak danou barvu složit (vyčíslené hodnoty jednotlivých barevných složek), avšak neříkají nic o vizuální podobě dat reprodukováných na odlišných zařízeních. Naopak souřadnice v nezávislém barvovém prostoru definují vizuální podání barev bez znalosti vyjádření hodnot dílčích barevných složek. V této diplomové práci bylo využito dvou transformací barev z barevného modelu RGB do modelu HLS a CIELAB, a to v závislosti na hodnocení daného typu bakteriálního nosiče.

Převod RGB na → CIELAB pro nanovláknenné nosiče

Barevný model CIELAB je založen na lidském vnímání barev tak, aby obsáhl množinu všech barev, které lze zachytit lidským okem. Jak bylo uvedeno výše, důležitý aspekt barevné soustavy CIELAB vychází z jeho nezávislosti na zařízení, a proto je objektivní. Uvedená barevná soustava (viz Obr. 17) vychází z předpokladu, ve kterém stejně subjektivně vnímané vjemy barvy odpovídají stejné vzdálenosti a naopak. V prostoru CIELAB jsou rozdíly mezi body vykresleny tak, aby korespondovaly k vizuálním rozdílům mezi vykreslenými barvami [5, 39].



Obr. 17: Geometrická reprezentace modelu CIELAB [39]

Osa L je osou definující měrnou světlost, která pokrývá rozsah hodnot z intervalu od 0 (černá) po 1 (bílá). Souřadnice chromatických os a^* , b^* nejsou nijak numericky limitovány, reprezentují rozsahy od zelené (záporná část osy a^*) po červenou (kladná část osy a^*) a od modré (záporná část osy b^*) po žlutou barvu (kladná část osy b^*) [5, 38, 39].

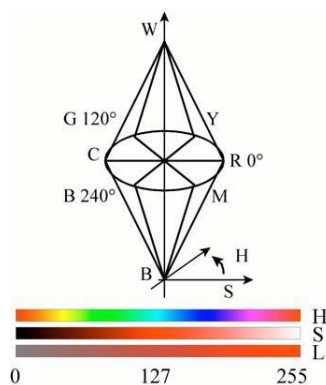
Transformaci barev vytvořených RGB snímků do barevného prostoru CIELAB lze využít především pro snímky zachycující biofilm na nanovláknenném nosiči. Na těchto snímcích jsou viditelné i pouhým okem tři základní rozlišitelné barvy. Černá barva, která reflektuje pozadí (mikroskopické sklo, na kterém je „namotané“ nanovlákneno), dále bílá až šedá reprezentující samotný nanovláknenný nosič a žlutá až hnědá znázorňující biofilm. Vzhledem k barevné informaci uložené v chromatických složkách a^* , b^* je segmentace (vizuální rozdíl barev) založena na rozdílu mezi dvěma barvami, který lze změřit pomocí Euklidovské vzdálenosti, což v barevném prostoru RGB není možné.

Oddělení jednotlivých barevných skupin/složek (pozadí-nosič-biofilm) v a^* , b^* je prováděno shlukovacím algoritmem K-Means užívaným ke stanovení barevného

seskupení, které se vyskytuje v sadě dat. Pro účely diplomové práce byly barevné plochy vyčleněny do tří shluků užitím Euklidovské vzdálenosti. Barevným objektům je algoritmem přiřazen index a místo v prostoru. Seskupené objekty v rámci každého shluku jsou od sebe ve shluku vzdáleny minimálně a co nejdále od dílčích objektů jiného shluku (podle zvoleného počtu barev/shluků), pokud jsou ignorovány změny jasu [5].

Převod RGB na → HLS u nosičů AnoxKaldnes K3 a PAQ_34

Barevný model HLS (viz Obr. 18) je rovněž jako CIELAB založen na lidském vnímání barev vzhledem k prostoru RGB, který je vytvořen pro zobrazení objektů na určitém typu zařízení. Základními složkami tohoto prostorového modelu jsou barevný tón H (hue), sytost S (saturation) a světlost L (lightness). Je tvořen dvěma kužely spojenými podstavami k sobě. Barevný tón je definován úhlem z intervalu $<0, 360^\circ>$, svislá osa kuželů reflektuje světlost měnící se od 0 (černá barva, spodní vrchol) do 1 (bílá, horní vrchol). Sytost nabývá na hraně podstav kuželů hodnoty 1 a klesá k nule směrem k ose. Na kružnici společných podstav se nacházejí nejjasnější čisté barvy červená, žlutá, zelená, tyrkysová, modrá a fialová. Tvar HLS modelu odpovídá skutečnosti, že člověk vnímá nejvíce barev při průměrné světlosti [38, 40].



Obr. 18: Geometrická reprezentace modelu HLS [40]

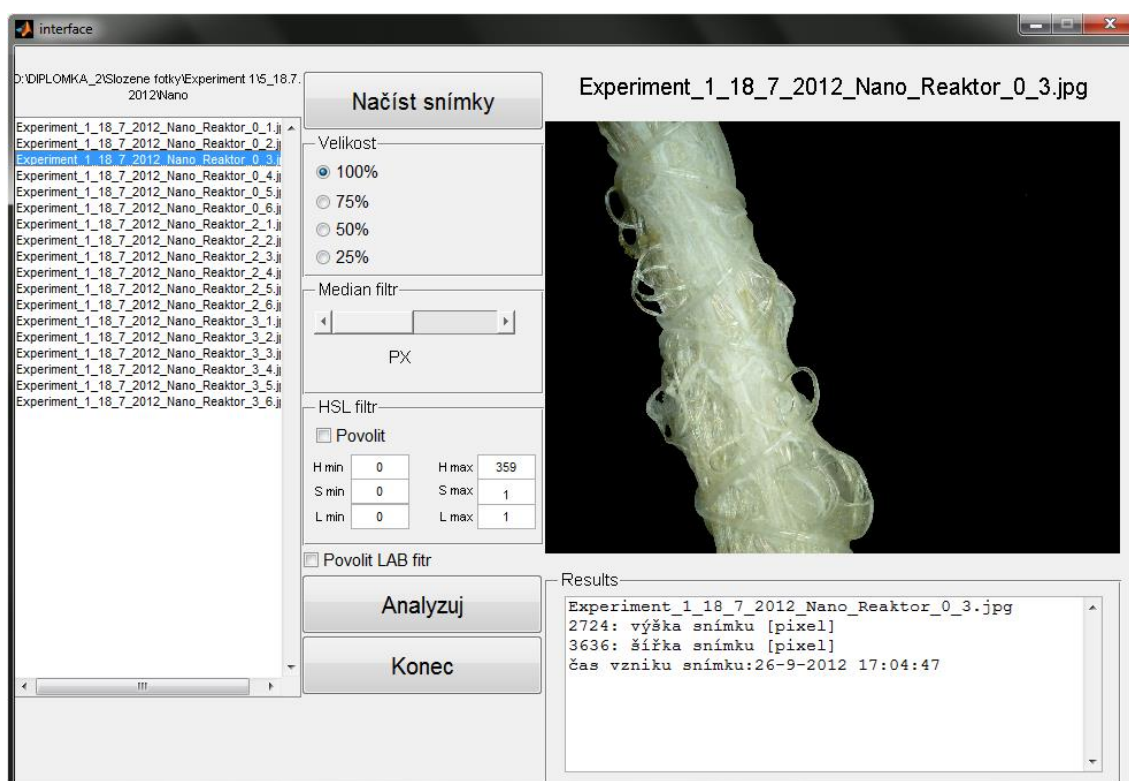
K hodnocení míry růstu bakteriální populace komerčního nosiče AnoxKaldnes K3 i nosiče PAQ_34 byl využit k účelu předzpracování snímků v rámci této diplomové práce vytvořený HLS filtr dle matematického popisu [41] v programovém prostředí Matlab. Uvedené polyetylenové nosiče nemají hladkou strukturu povrchu snímaných částí jako nanovláknenné nosiče upevněné na mikroskopickém skle, a proto je na vytvořených snímcích viditelná různorodost barev nosiče. Na snímcích se rovněž

vyskytují stíny způsobené nehomogenitou osvětlení (nedokonalost optických prvků mikroskopu) a nerovností (hrbolatý povrch) struktury povrchu nosičů.

V grafickém programu Image processing Lab [42], byl intuitivně zvolen příslušný barevný odstín, který reflektoval zbarvení biofilmu na snímku. Poté bylo vhodně zvoleno nasycení a světlost tak, aby po filtraci zůstal vyobrazen na snímku pouze biofilm. Hodnoty H zůstávají při změně S a L neměnné, čehož se dá při míchání barev v prostoru RGB dosáhnout jen stěží. Hodnoty nastavení byly následně importovány do vytvořeného uživatelského rozhraní jako vstupní proměnné HLS filtru, a to pro každou specifickou sadu snímků pořízených při jednom odběru. Tato skutečnost je dána z důvodu odlišného nastavení parametrů mikroskopu, potažmo fotoaparátu (prosvícení, gradace, sytost, režim fotoaparátu apod.) každého z dílčích odběrů, stadia nárůstu biofilmu (odstíny hnědé od světlé po tmavou, světle hnědá – tenká vrstva biofilmu), povrchové struktury nosiče nebo odlišného způsobu předzpracování snímků (kontrast, jas atd.).

3.4.3 Grafické uživatelské rozhraní

S využitím prostředků prostředí MATLAB R2009b (Image processing toolbox, Graphical User Interface) bylo v rámci této práce navrženo a programově realizováno grafické uživatelské rozhraní (GUI), které sloužilo k nastavení parametrů dílčích metod aplikovaných na pořízené mikroskopické snímky nosičů biofilmu. Při tvorbě nové aplikace byl velký důraz kladen na vytvoření uživatelsky příznivého rozhraní, které umožňovalo pohodlné nastavení parametrů zpracování analýzy obrazu, a to i bez hlubší znalosti problematiky zpracování vstupních dat.



Obr. 19: Nově vytvořené grafické uživatelské rozhraní GUI

Tato aplikace využívá návrhového editoru prostředí GUIDE (Graphical User Interface Environment), které poskytuje sadu návrhových nástrojů, u kterých je možné nastavit/měnit jejich vlastnosti. Jedná se například o tlačítka, listboxy, panely apod. GUIDE vytváří soubor s příponou *fig* (obsahuje informace o grafickém okně) a také generuje výsledný M-file (soubor s příponou *m*), který obsahuje programový kód k ovládání, inicializaci a spuštění GUI. Aktivace jednotlivých komponent je realizována s využitím GUIDE pomocí „callback“ funkcí. Toto řešení grafického uživatelského rozhraní je univerzální a časově nenáročné, avšak generovaný zdrojový kód nemusí být vždy optimální.

Programové hodnocení struktury biofilmu začíná načtením jednotlivých snímků nosičů získaných pomocí mikroskopického snímkování, přičemž jsou v aplikaci podporovány snímky uložené ve formátu PNG, BMP, JPG a TIFF. Pomocí tlačítka ‚Načíst snímky‘ se specifikuje, z jaké složky a jaké snímky budou načteny do listboxu. Uživatel si následně může k analýze obrazu vybrat jeden nebo více snímků tzn., že interface umožňuje dávkové zpracování. Při kliku na daný snímek se následně ve výpisovém ‚Results‘ okně zobrazí jeho název, čas, kdy byl vytvořen, a jeho rozměry [pixel] a v objektu ‚Axes‘ je vyobrazen. Dále je ve static textu, v levém horním rohu

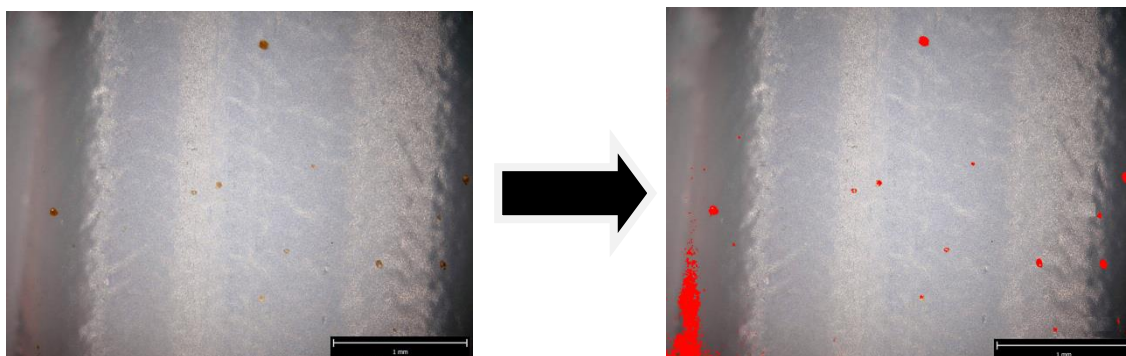
rozhraní, vypsána cesta odkud jsou snímky načteny. Po načtení požadovaných snímků má uživatel možnost změny velikosti rozlišení obrazu (v tomto případě bylo využito 75% zmenšení obrazu), a to zejména z důvodu urychlení obrazového hodnocení. Další komponentou programového prostředku je možnost využití mediánového filtru, který bývá aplikován v případech, kdy se vyskytuje šum v obraze. Posléze je vstupní RGB obraz převeden do jiného barevného prostoru prostřednictvím volby některého z obrazových filtrů HSL nebo LAB filtru. V případě HSL filtru je nutné vhodně zvolit počáteční nastavení vstupních parametrů – H_{min} , H_{max} , L_{min} , L_{max} , S_{min} , S_{max} tak, aby daný biofilm na snímku po filtraci co nejvíce odpovídal reálnému zobrazení. Volba hodnot vstupních parametrů vytvořeného interface je závislá na aplikaci, respektive především na parametrech a kvalitě pořízení snímků.

Po nastavení všech počátečních parametrů následuje spuštění samotné obrazové analýzy klikem na tlačítko „Analyzuj“, které inicializuje volání jednotlivých funkcí pro výpočet charakterizace hodnocení 2D struktur biofilmu, jako například fraktální dimenze, texturní entropie, difuzní vzdálenosti apod. Výsledné hodnocení celých snímků, potažmo objektů reflektujících bakteriální biofilm je zapsáno do předem nadefinovaných buněk tabulkového procesoru Microsoft Excel. K tomuto účelu byla využita funkce `xlswrite` (definován název souboru Results). Pokud se Results.xls nenachází v pracovním adresáři, Matlab ho sám vytvoří. Zdrojová data jsou uložena pro rychlý zápis do tabulkového procesu v maticích a zápis dat probíhá najednou po analýze každého ze snímků. Názvy jednotlivých listů MS Excel sešitu jsou shodné s názvy dílčích analyzovaných snímků (počet znaků v názvu je menší nebo roven 31).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavní náplní předkládané práce bylo využití obrazové analýzy jakožto moderního přístupu hodnocení bakteriálního biofilmu na nosičích biomasy a definování parametrů, které charakterizují strukturální povahu nárůstu biofilmu. Za účelem studia nárůstu biofilmu v závislosti na okolních podmínkách (tj. např. různé typy nosičů biomasy, vliv salinity) i vývoje jeho strukturálních parametrů v čase byly provozovány dva odlišné experimentální laboratorní modely s pravidelnými odběry vzorků určených k mikroskopickému snímání. Následně byl vytvořen programový kód v prostředí Matlab R2009b schopný automatické analýzy obrazu vytvořených snímků. Z důvodu velkého množství fotografií a malé difference měrné vodivosti mezi bioreaktorem 1 (měrná vodivost $10 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) a 2 (měrná vodivost $20 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), byl výběr k obrazové analýze prvního experimentu selektován na snímky biofilmu reaktoru prvního, třetího (měrná vodivost $40 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) a čtvrtého (měrná vodivost $60 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$).

V analýze obrazu byl kladen velký význam nejenom na získání kvalitního digitalizovaného obrazu předlohy, ale klíčová byla také segmentace obrazu – rozčlenění obrazu na místa zájmu a odstranění těch částí, které jsou z hlediska dalšího zpracování nepodstatné (oddělení objektů od pozadí). Teprve pak bylo možné provést měření a stanovit požadované morfologické vlastnosti objektů. Na následujícím Obr. 20 je znázorněn příklad segmentace obrazu na místa zájmu pomocí HSL filtru.



Obr. 20: Ukázka segmentace analyzovaného obrazu

Snímek vlevo na Obr. 20 reprezentuje detail povrchu nosiče AnoxKaldnes K3 a uchycený biofilm, snímání proběhlo digitálním fotoaparátém uchyceným k laboratornímu mikroskopu. Červená pole na druhém snímku představují segmentované shluky, které reprezentují nárost biofilmu na nosiči. Pro lepší představu

reálné velikosti lokalizovaných objektů je na snímcích také zobrazeno kalibrované měřítko odpovídající hodnotě 1 mm.

4.1 VÝSLEDKY OBRAZOVÉHO HODNOCENÍ 2D PARAMETRŮ

Po segmentaci obrazu mikroskopických snímků nosičů biofilmu byly vytvořenými programovými kódy vyhodnoceny tyto 2D charakteristiky: počet objektů na snímku, obvod objektů, plošná porozita biofilmu, texturní entropie, homogenita a energie snímku, maximální a průměrná difuzní vzdálenost, horizontální a vertikální délky běhu a fraktální dimenze. V této části diplomové práce budou s ohledem na velkou rozsáhlost měřených dat uvedeny pouze parametry: hodnocení počtu objektů a jejich obvodu, plošné porozity a maximální difuzní vzdálenosti. Zbylé charakteristiky jsou uvedeny na příloženém DVD.

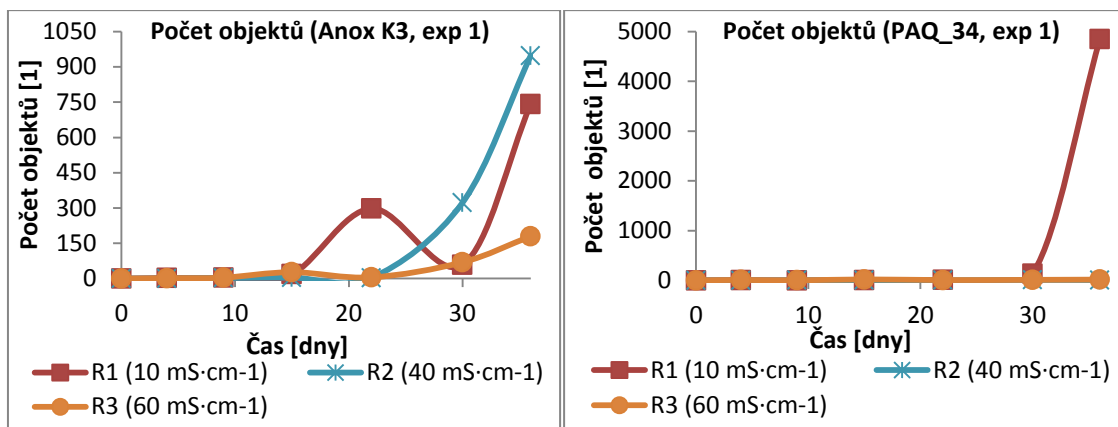
4.1.1 Počet objektů

Na následujících grafech (Obr. 21 – Obr. 24) jsou uvedeny počty separovaných shluků ploch, které reprezentují biofilm na snímcích zvolených nosičů obou laboratorních experimentů (viz Obr. 14 a Obr. 15) po celou dobu kultivace. Jednotlivé bioreaktory obsahovaly médium o různé salinitě – viz Tab. 1.

Tab. 1: Měrná vodivost v jednotlivých bioreaktorech

MĚRNÁ VODIVOST [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$]			
LABORATORNÍ EXPERIMENT 1		LABORATORNÍ EXPERIMENT 2	
Reaktor 1	10	Reaktor 1	10
Reaktor 2	40	Reaktor 2	40
Reaktor 3	60	Reaktor 3	90

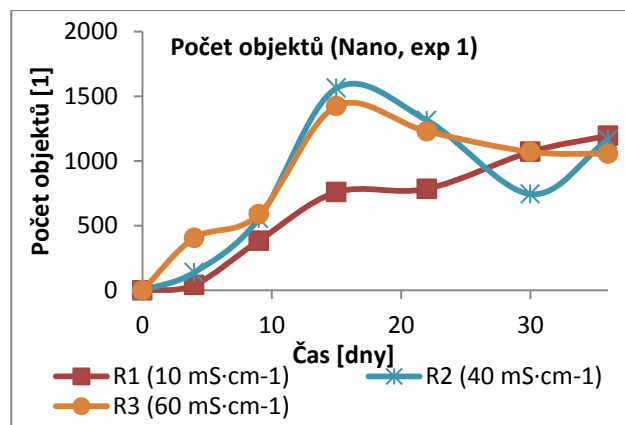
Hodnota měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech je uvedena vzestupně s označením daných bioreaktorů, tzn. označení „R1 ($10 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)“ je vztaženo k počtu objektů zjištěných v bioreaktoru 1 s danou hodnotou měrné vodivosti atd. Uvedené hodnoty v následujících grafech jsou odvozeny od průměrného hodnocení dílčích parametrů analyzovaných snímků jednotlivých charakteristik v průběhu kultivace.



Obr. 21: Počet lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

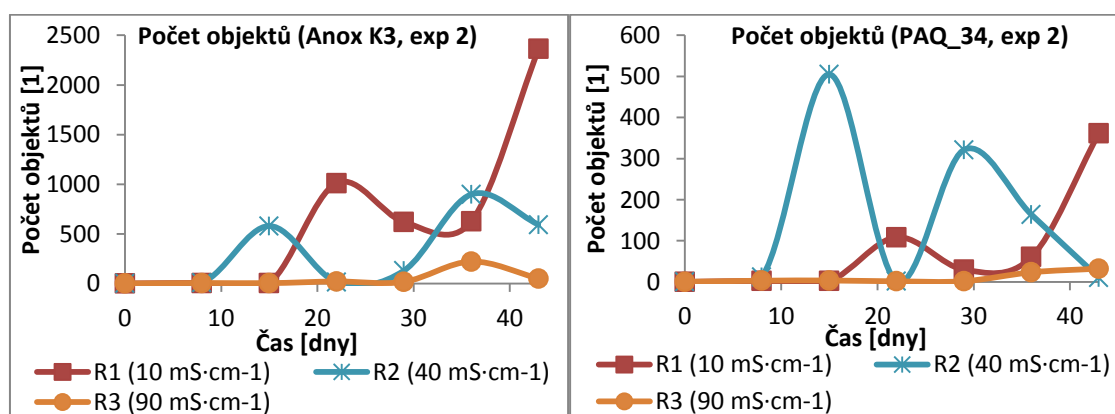
Počet objektů lokalizovaných na komerčním nosiči AnoxKaldnes K3 experimentu 1 vzrůstal postupem času u všech bioreaktorů, načež ke konci kultivace měl přírůstek objektů exponenciální průběh. Nejvíce byl kolonizován tento nosič umístěný v prvních dvou reaktorech s nízkou mírou salinity. Vysoká salinita tedy do jisté míry potlačovala rychlost kolonizace nosiče. Na nosiči biomasy PAQ_34 byl pozorován podobný průběh kolonizace, avšak byl zde viditelný diametrální rozdíl nárůstu objektů v reaktoru s nejnižší salinitou koncem časového období. Vzhledem ke specifické morfologii a fyzikálně-chemickým vlastnostem povrchu těchto polyethylenových nosičů byly zpočátku na snímcích pozorovány rozměrově větší objekty malého počtu (řádově jednotky objektů) a následně s přibývajícím časem byl povrch nosičů ve větším množství kolonizován velmi prostorově malými útvary biofilmu.

„Nano“ nosiče umožňovaly bakteriální populaci tvorbu celistvých ploch na povrchu pletené nitě s nanovlákným povrchem. Z počátku množství selektovaných ploch tvořících biofilm téměř lineárně rostlo (viz Obr. 22), poté se menší útvary biofilmu shlukovaly a začaly tvořit plošně větší celky, které v závěru prvního experimentu pokryly většinu povrchu nosiče.

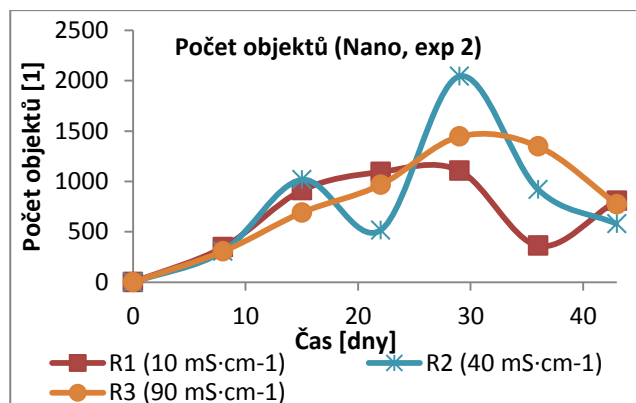


Obr. 22: Počet lokalizovaných objektů na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Na následujícím Obr. 23 je uveden časový vývoj počtu objektů, které kolonizovaly povrch komerčních nosičů během druhého experimentu. U těchto nosičů se při kvantifikaci většiny požadovaných charakteristik vyskytovaly skokové změny, které byly pravděpodobně zapříčiněny změnami podmínek v bioreaktorech jako například časté výkyvy hodnot pH a teploty. Průběh jednotlivých křivek rovněž naznačuje nerovnoměrné pokrytí povrchu nosiče mikroorganismy. Z vynesných křivek je také patrná jistá podobnost nárůstu/poklesu počtu analyzovaných uskupení s rozdílem rozpoznávaného množství objektů. Opět, jako u experimentu 1, byly nejvíce osídlovány povrchy nosičů, které byly umístěny do média o nízké salinitě, tj. reaktor 1 a 2.



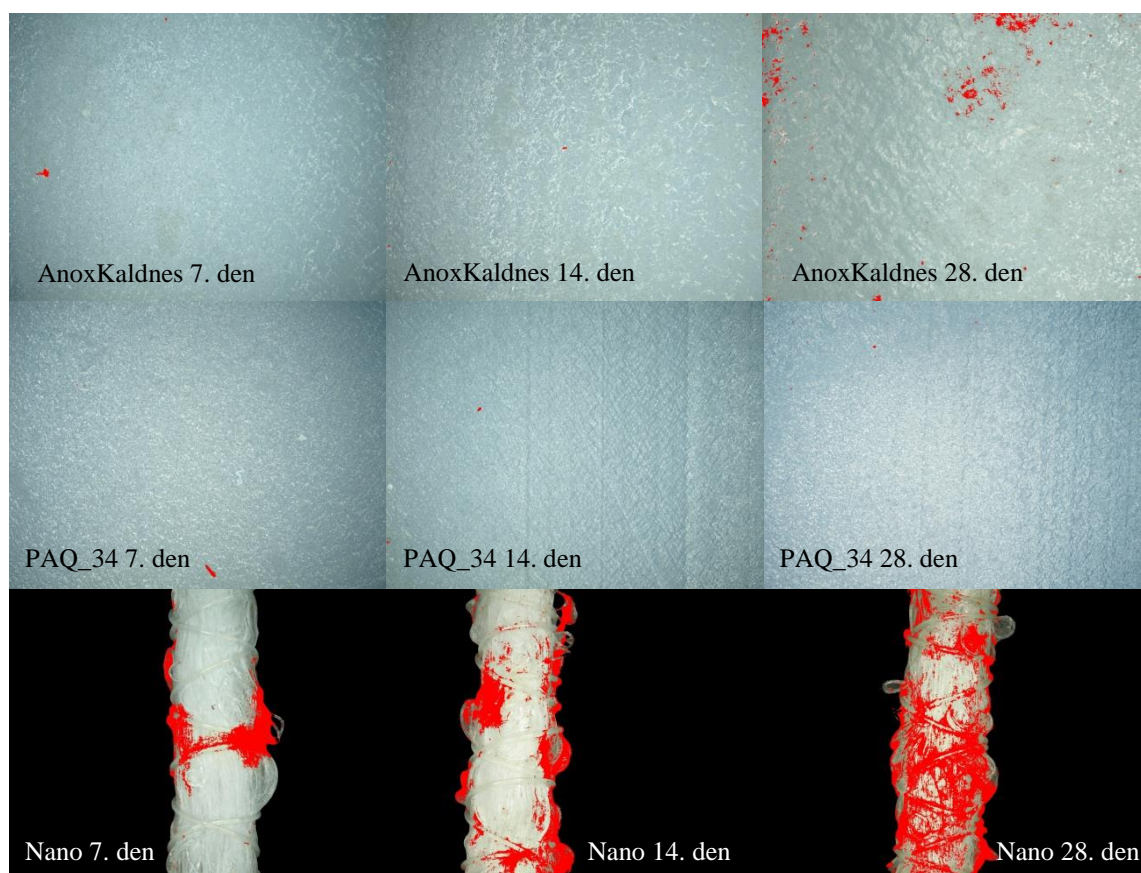
Obr. 23: Počet lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)



Obr. 24: Počet lokalizovaných objektů na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)

Standardně užívané polyethylenové nosiče nedisponují takovou subvencí kolonizace organismů jako je tomu u modifikovaných nanovlákněných nosičů biomasy. Nanovláknna, resp. jejich charakteristická morfologie zajišťují stabilnější kolonizaci nosiče a tím i biodegradaci polutantů v reaktoru; mikroorganismy na nosičích mají vyšší schopnost přizpůsobit se extrémním okolním vlivům nebo nárazovým šokovým podmínkám [20]. Trendy křivek jsou z tohoto důvodu méně skokové, mají zpočátku spíše lineární průběh navyšujícího se počtu lokalizovaných objektů a s narůstajícím se shlukováním objektů do vyšších celků se jejich počet snižuje. Biofilm byl po celou dobu kultivace kompaktnější a stabilnější. Nejvíce vyrovnaný průběh reprezentuje křivka nanovlákněného nosiče bioreaktoru 3 o měrné vodivosti média $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Pro bližší představu kinetiky růstu bakteriálního biofilmu je na Obr. 25 uveden nárůst biofilmu v závislosti na čase experimentu 2, tj. po 7, 14, 28 dnech kultivace laboratorního experimentu 2. Reaktor 1 obsahoval nosiče biomasy AnoxKaldnes K3, PAQ_34 a nanovlákněný smotek.



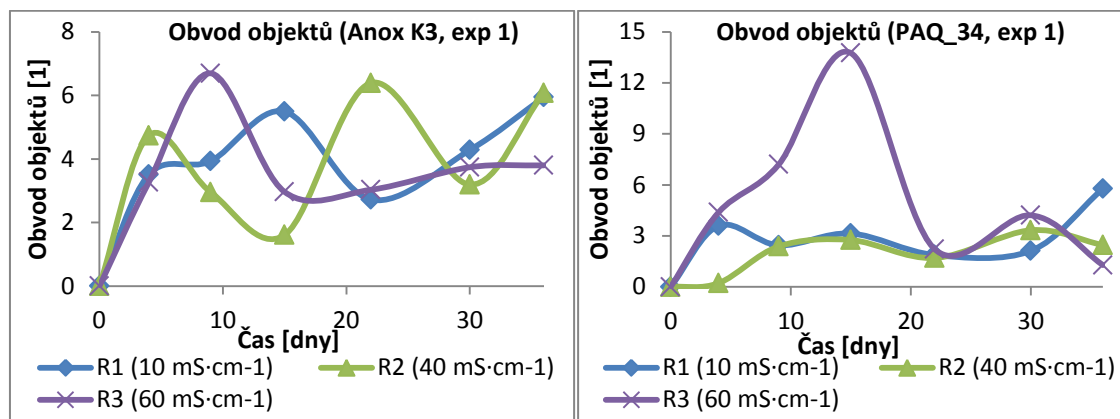
Obr. 25: Časový vývoj nárůstu biofilmu na testovaných nosičích

Z těchto snímků je patrná difference nárůstu biofilmu mezi komerčními nosiči AnoxKaldnes K3, PAQ_34 nosiči a nosiči nanovláknými. Nanovláknenné nosiče dosahovaly vyšší míry kolonizace/zachycení mikroorganismů, a tudíž i rychlejší kinetiky růstu v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 (viz Obr 25). Důvodem vyšší míry kolonizace v případě nanovláknenného nosiče byl vysoký měrný povrch nanovláken vykazující vysokou pórovitost povrchu, malé rozměry pórů a vysokou míru adhezivitu. Před vlastní tvorbou kompaktních biofilmových struktur na polyetylenových nosičích musí mikroorganismy nejprve mírně narušit, resp. strukturalizovat jejich povrch, který je specifický svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Teprve až po narušení povrchové struktury nosiče dochází ke kolonizaci mikroorganismy [13].

4.1.2 Obvod objektů

Obvod objektů na nosiči biomasy je dalším kvantifikovatelným rysem popisujícím strukturu biofilmů, která odráží základní procesy, které se vyskytují v biofilmu: adheze a upoutání, růst mikroorganismů a jejich oddělení. Výstupy

obrazové analýzy prvního experimentu naznačily výkyvy v nárůstu obvodu shluků biofilmu na nosičích AnoxKaldnes K3 a PAQ_34. Trend křivek v případě nosičů AnoxKaldnes K3 byl v celém měřítku rostoucí. Zmíněné výkyvy mohly být způsobeny strháváním a odplavením částí biofilmu, které nebyly dostatečně vázány k podkladu. Nárůst/pokles číselného vyjádření délky hranice objektů byl důsledkem vlivu střížných sil v bioreaktorech, které působily na jednotlivé nosiče. V závěru experimentu dosahovaly největší hranice selektovaných ploch objekty v prvním a druhém bioreaktoru, třetí mírně zaostával. Detailní průběhy změn ve velikosti obvodů objektů fixovaných na komerční nosiče biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 zjištěné během prvního experimentu jsou uvedeny níže na Obr. 26. Na Obr. 27 jsou poté uvedeny vývoje obvodových hranic objektů lokalizovaných na nanovláknenných nosičích biomasy.

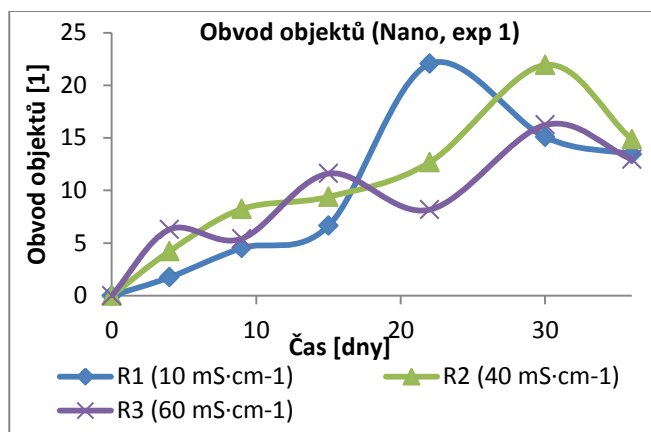


Obr. 26: Obvod lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Trendy vynesných obvodových charakteristik nosiče PAQ_34 mají až na průměrný obvod objektů v bioreaktoru s nejvyšší hodnotou měrné vodivosti/salinitou mírně rostoucí povahu. V reaktoru 3 se utvářely velké celky již v počátcích experimentu, nutno dodat, že v malé kvantitě. S nárůstem malých kolonií se délka hranice objektů, podobně jako u nosiče AnoxKaldnes K3, zmenšovala.

Za faktorem nesourodého růstu stojí také patrně nevhodná instalace samotných nosičů biomasy. Ty byly přilepeny na mikroskopická sklíčka, která byla posléze uchycena mezi dvě silikonové kruhové hadičky tak, aby byla umístěna v reaktoru ve svislé poloze a tvořila válec kopírující tvar bioreaktoru o menším průměru. Smyslem takového umístění nosičů byla rovnoměrná aerace, tzn., zajištění přísunu pravidelného

a dostatečného množství kyslíku ke každému nosiči. Při pravidelných odběrech však nebyl tvar válce, respektive rovnoměrná aerace zachována, neboť některá sklíčka se uvolnila a zůstala na dně reaktoru, kde vznikala kal obsahující větší množství biomasy, než v ostatních částech reaktoru.



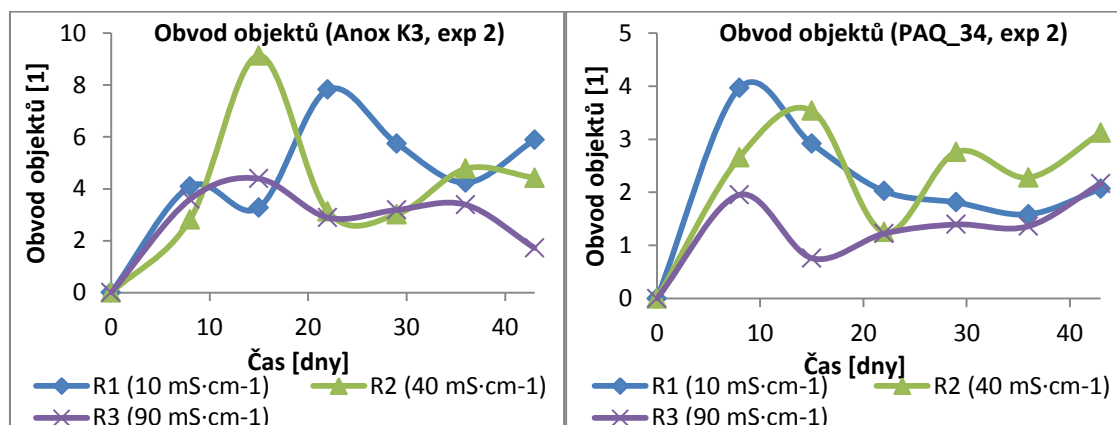
Obr. 27: Obvod lokalizovaných objektů na nanovlákných nosičích biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Jak již bylo výše zmíněno, užití nanovláken pro podporu růstu biomasy zajišťuje stabilnější kolonizaci v nekonzistentních až extrémních podmínkách. Stejná situace nastala i u kvantifikace obvodu objektů. Oproti nosičům PAQ_34 i AnoxKaldnes K3 umožňuje nanovláknenné pokrytí nosné nitě pravidelné prorůstání biofilmu po celém povrchu. Nárůst obvodu byl až na malé odchylky rovnoměrně rostoucí, a to u všech tří reaktorů o různé hodnotě měrné vodivosti. Nejvyšší absolutní hodnoty obvodové hranice, obdobně jako u některých předchozích charakteristik, byly zjištěny v prvním reaktoru s médiem o minimální hodnotě měrné vodivosti.

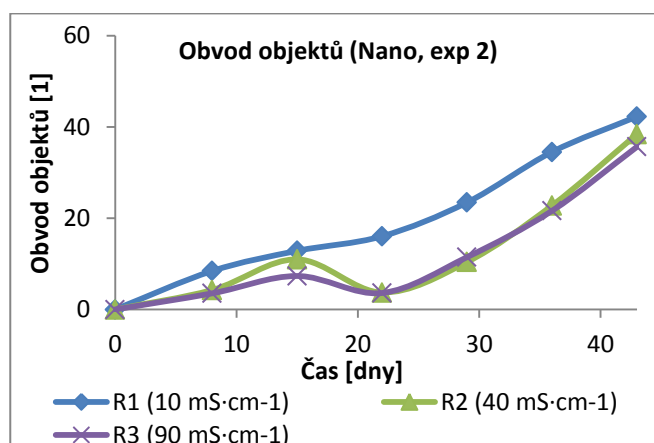
Určitá podobnost průběhů křivek je také patrná z následujících grafů (viz Obr. 28) druhého experimentu. Ty odrážejí hodnocení velikosti obvodu objektů prvních dvou hodnocených nosičů s tím rozdílem, že průměrné vyjádření obvodu nosiče AnoxKaldnes K3 dosahuje dvojnásobku hodnot vzhledem k nosiči PAQ_34. Nejlepších hodnot opět dosahovaly první dva reaktory.

Z Obr. 29 je patrné, že se obvod objektů lokalizovaných na „Nano“ nosičích druhého experimentu téměř lineárně zvětšoval, a to u všech bioreaktorů. Stejně jako v ostatních případech, nejvyšší rychlosti nárůstu biofilmu bylo dosaženo při nejnižší

hodnotě solnosti média v reaktoru. Navíc v tomto případě byly také pozorovány minimální výkyvy, což dokazuje rovnoměrný růst plochy obsazené biofilmem.



Obr. 28: Obvod lokalizovaných objektů na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)

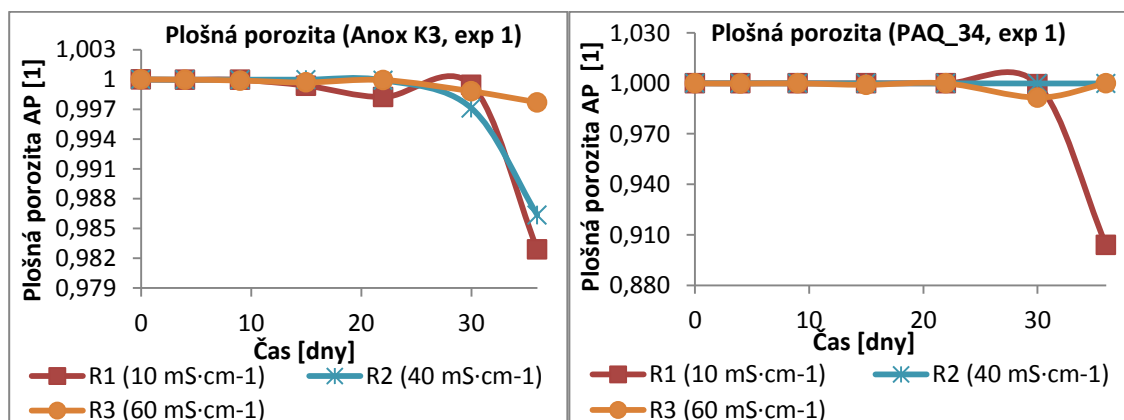


Obr. 29: Obvod lokalizovaných objektů na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)

4.1.3 Plošná porozita AP

Plošná porozita (AP) vyjadřuje poměr plochy zabírající na snímku prázdná místa vztažené k celkové ploše snímku. Lze tedy také vyjádřit plochu obsazenou biofilmem. Převod výpočtu je následující: $(1 - AP) \times 100 [\%]$. Z této hodnoty je možné si snadno představit plochu pokrytou biofilmovým nárůstem. Na začátku prvního experimentu byly dle analýzy obrazu lokalizovány na snímcích sice rozměrově větší objekty, ale s řídkým výskytem. Z tohoto důvodu tato skutečnost neměla velký vliv na vývoj plošné porozity, neboť plocha obsazená shluky biomasy na polyethylenových nosičích byla

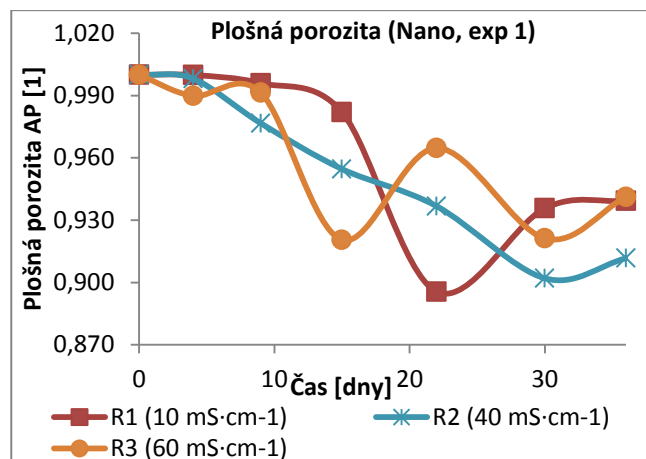
velmi malá. Rostoucí počet objektů (nepatrně i jejich obvodu), který byl pozorován od druhé poloviny kultivační doby, koreluje se snižováním hodnoty AP, jelikož tyto dvě veličiny jsou na sobě závislé.



Obr. 30: Plošná porozita na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

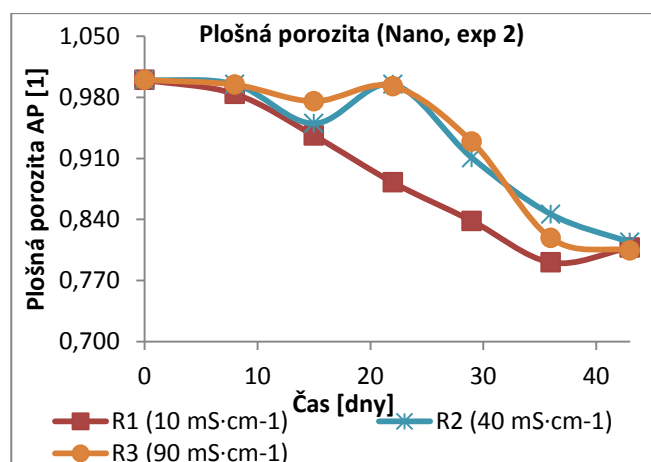
Souhrnně lze konstatovat, že co se týče obsazenosti nosičů biofilmem laboratorního experimentu 1 (viz Obr. 30), nejlepší výsledky byly zjištěny v bioreaktoru 1 s hodnotou měrné vodivosti média 10 mS·cm⁻¹ a poté následovaly bioreaktory 2 s hodnotou 40 mS·cm⁻¹. Jako nejhůře kolonizované byly pozorovány povrchy nosičů v bioreaktoru 3, tj. s měrnou vodivostí média 60 mS·cm⁻¹. Bylo také zjištěno, že v závěru experimentu byl mnohem více plošně zaplněn biofilmem nosič PAQ_34 bioreaktoru 1, a to zejména díky několikanásobnému počtu lokalizovaných objektů s obdobnými hranicemi obvodů. Naopak, v reaktorech 2 a 3 bylo více biofilmového nárůstu pozorováno na nosičích AnoxKaldnes K3.

Následující Obr. 31 zobrazuje výstupy hodnocení nanovláknenných nosičů jednotlivých bioreaktorů modelu 1 na základě míry kolonizace nosiče biofilmem, resp. prázdných míst v závislosti na čase experimentu. Z grafu je patrné rovnoměrnější a výraznější osídlování povrchu nosiče biofilmem, než u nosičů AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 dané rychle vzrůstajícím počtem i obvodem objektů už od počátku kultivace. Nejnižších hodnot AP, tj. nejvíce kolonizovaný povrch nosiče během experimentu 1 byl zjištěn v případě „Nano“ nosiče umístěného do média o měrné vodivosti 10 a 40 mS·cm⁻¹.

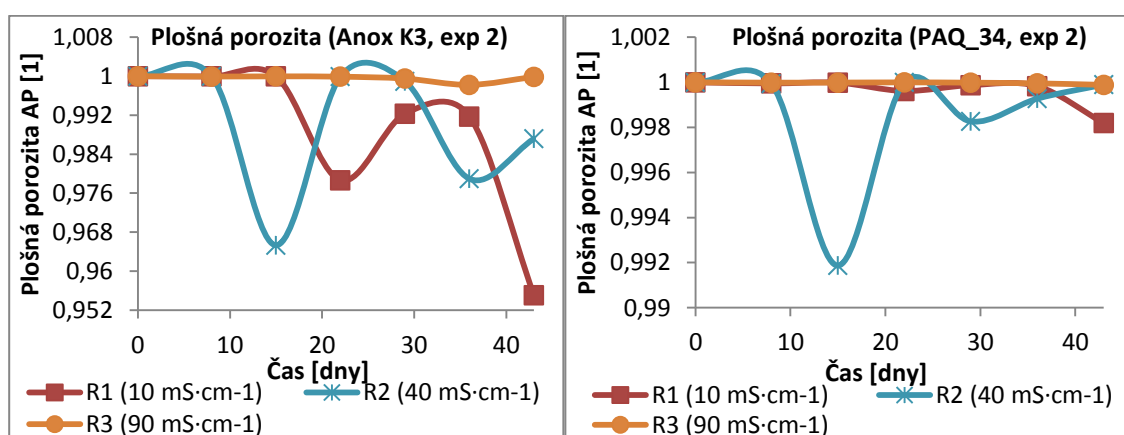


Obr. 31: Plošná porozita na nanovláknenném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Z grafů uvedených na Obr. 32 a 33 experimentu 2 je možno získat ucelený obraz o kinetice poklesu plošné porozity v důsledku kolonizování nosičů. Je zřejmé, že mikroorganismy na nanovláknenných nosičích mají výrazně vyšší míru adheze, a tudíž i rychlejší kinetiku růstu než na komerčních nosičích AnoxKaldnes K3 a PAQ_34. Z Obr. 32 je patrný rovnoměrně klesající trend všech křivek AP, což opět naznačuje u nanovláken rovnoměrný růst bakteriální populace. Grafy na Obr. 33 prezentují tutéž charakteristiku jako předchozí graf, ovšem s komerčně vyráběnými nosiči biofilmu. Výsledky provedených analýz ukázaly, že hodnoty plošné porozity klesaly v průběhu experimentu, tedy s rostoucím časem, a to jak u nosiče AnoxKaldnes K3, tak i v případě nosiče PAQ_34. Zejména v druhém bioreaktoru byly také pozorovány určité výkyvy tohoto parametru. Ty byly pozorovány jako důsledek skokového kolísání hodnot dvou předchozích parametrů, a to počtu lokalizovaných objektů a jejich obvodu. Nejméně prázdných ploch u komerčních nosičů obsahovaly snímky reprezentující opět reaktor 1 a 2. Rovněž jako u experimentu 1, i v tomto případě byly lepší výsledky zjištěny s nosičem AnoxKaldnes K3 než s nosičem PAQ_34.



Obr. 32: Plošná porozita na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)



Obr. 33: Plošná porozita na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)

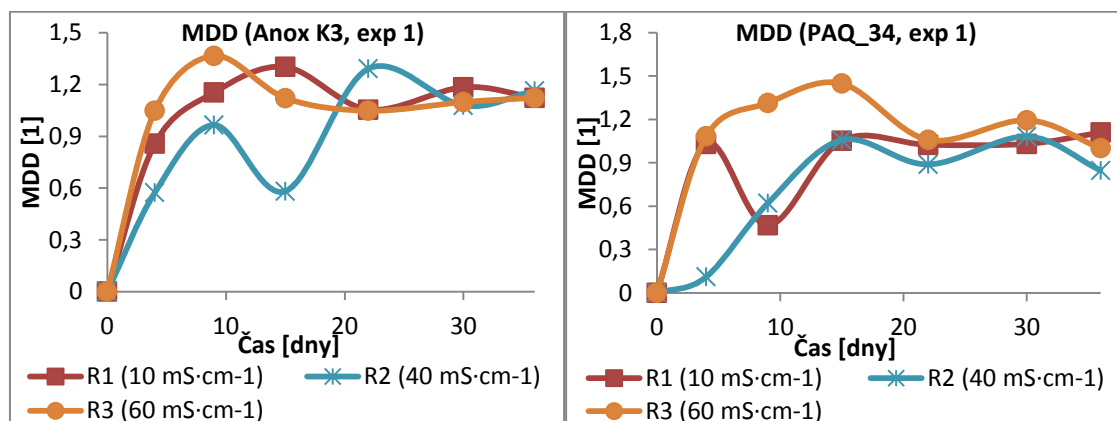
Jelikož nebyly u snímků nanovlákněných nosičů zohledněny koeficienty vyjadřující procentuální podíl plochy nosiče na snímku k celkové ploše snímku, vzájemné srovnání parametrů mezi nanovlákněnými a polyethylenovými nosiči by nebylo zcela objektivní. Z tohoto důvodu lze zmíněné srovnání udělat pouze odhadem. V současnosti je přepočítání plošného zaplnění v programových kódech realizováno, přičemž nanovlákněný nosič zabírá cca 28 % celkové plochy snímku.

4.1.4 Maximální difuzní vzdálenost (MDD)

Difuzní vzdálenost je dalším ukazatelem hodnocení struktury biofilmu. Odráží vzdálenost, kterou musí substrát urazit, aby se dostal do středu mikrokolonie buněk. MDD udává distanci od nejvíce vzdáleného pixelu ve shluku pixelů do nejbližšího prázdného shluku. Pokud se zvyšují difuzní vzdálenosti, je pravděpodobné, že bude

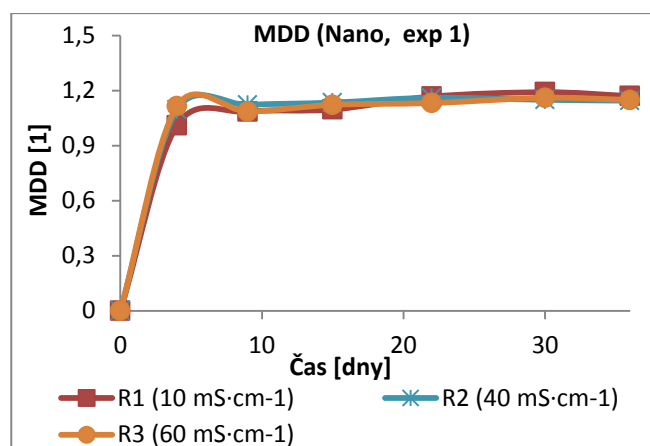
substrát vyčerpán dříve, než se dostane do střední části mikrokolonie, což může mít za následek např. odumírání buněk ve střední oblasti kolonií.

Oba komerční nosiče použité v prvním experimentu vykazovaly podobné trendy průběhů křivek (viz Obr. 34) s určitým kolísáním daných hodnot. Zpočátku lokalizované větší objekty malého počtu MDD navyšovaly, postupem času však byla zjištěna opačná tendence způsobená přibývajícími malými mikrokoloniemi velkého počtu.



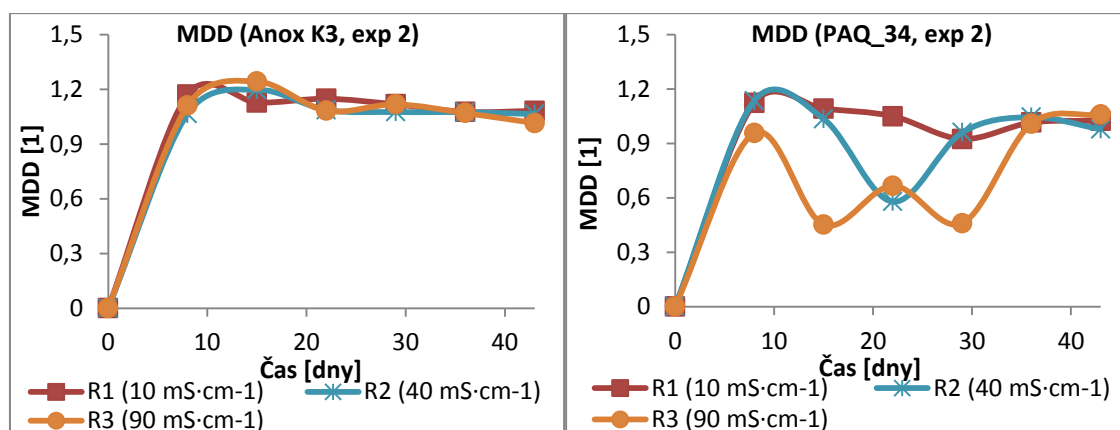
Obr. 34: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Pro nanovláknenné nosiče klesá počet objektů, tvoří se větší a kompaktnější shluky a maximální difuzní vzdálenost nevýrazně roste. Z Obr. 35 je dobře patrné, že vliv salinity na růst MDD nanovláknenného nosiče prvního experimentu byl malý, neboť uvedené průběhy křivek mají téměř totožný charakter.

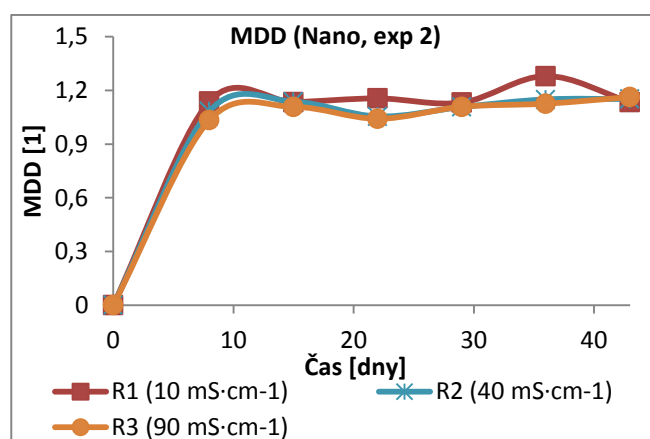


Obr. 35: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 1)

Z následujících grafů (viz Obr. 36, 37) vyplývá, že s rostoucím množstvím přichycených kolonií na nosičích AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 mírně klesala maximální difuzní vzdálenost a naopak nepatrně rostla MDD shluků biofilmu nanovlákněného nosičů. Tato skutečnost naznačuje obdobný trend s uvedenými charakteristikami prvního experimentu. Komerční nosiče AnoxKaldnes K3 a textilní nosiče pokryté nanovláknem vykazovaly během experimentu 2 rovnoměrnější vývoj maximální difuzní vzdálenosti, a to ve všech bioreaktorech. Hodnoty MDD mírně klesaly u nosičů AnoxKaldnes K3 a naopak rostly v případě nanovlákněného nosiče. Významné výkyvy ve sledovaných hodnotách byly zjištěny především u nosiče PAQ_34 v průběhu experimentu 2, a to u bioreaktoru 2 a 3. Tento jev byl způsoben hlavně nerovnoměrným pokrytím plochy bakteriální populací, o čem svědčí i charakteristika obvodové hranice lokalizovaných objektů.



Obr. 36: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nosičích biomasy AnoxKaldnes K3 a PAQ_34 v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)



Obr. 37: Maximální difuzní vzdálenost objektů lokalizovaných na nanovlákněném nosiči biomasy v závislosti na čase a měrné vodivosti média v jednotlivých bioreaktorech (experiment 2)

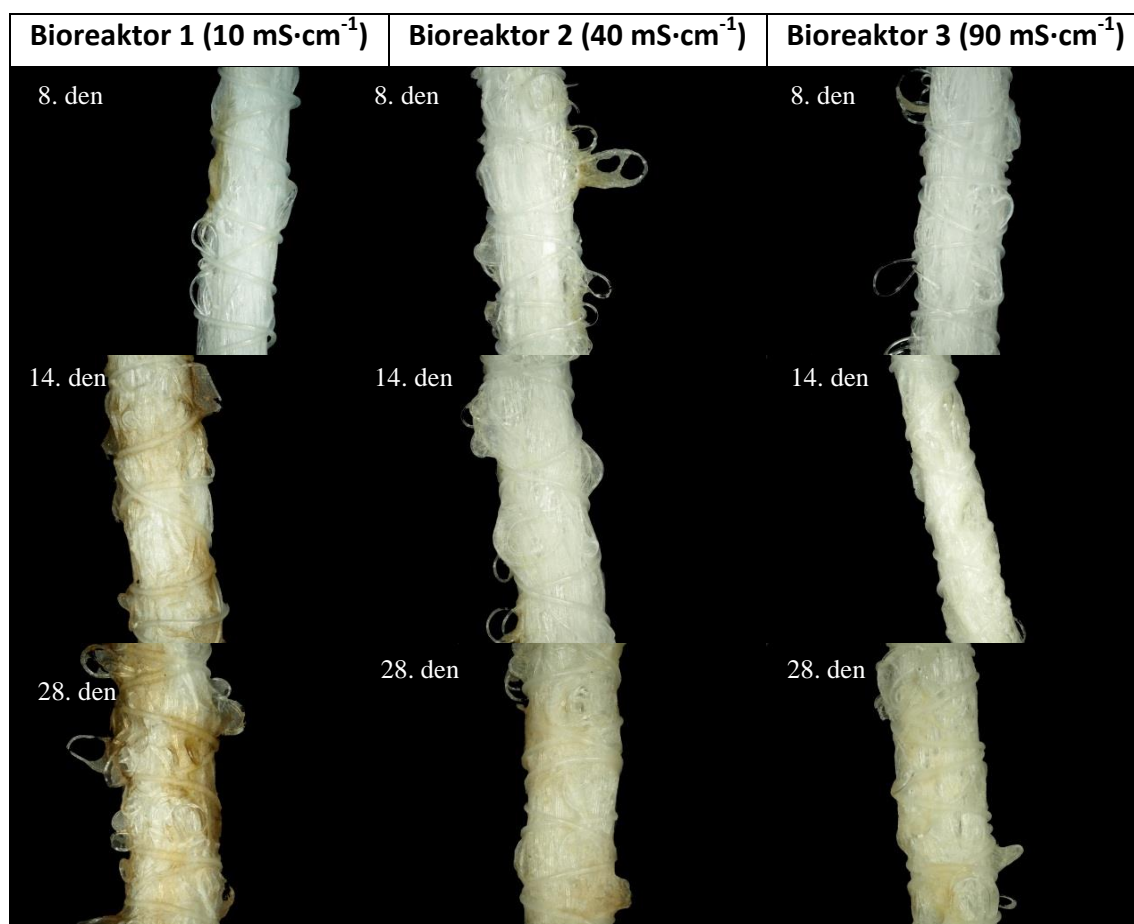
Z uvedených charakteristik maximální difuzní vzdálenosti vyplývá, že mikroskopické snímky (padesátinásobné zvětšení) analyzované rozbořem obrazu obsahovaly převážně rozměrově malé objekty, a že se na povrchu především komerčních nosičů nevytvářely příliš velké kolonie. Dalším faktorem malých hodnot MDD bylo zmenšení původních snímků biofilmu na 25 % jejich velikosti. Převážnou část biomasy tvořily jednopixelové objekty, a to i po kompresi snímků. Vnitřní část větších segmentovaných objektů nebyla vždy bakteriální populací stoprocentně obsazena, tzn., objekty obsahovaly póry, což mělo vliv nejenom na velikost MDD, ale i na ADD, na AHRL, na AVRL aj. Určitou roli zde hrálo i zmenšení obrazu. Důležitá je rovněž zvolená metoda lokalizace objektů. V předkládané práci byla použita metoda

alokace objektů bez případného zaplnění pórů, která odpovídá reálnému zobrazení. Použitím odlišné metody rozpoznání objektu, a to funkce lokalizující hranice objektů s jejím zaplněním, se hodnoty difuzních vzdáleností i běhových délek navýší.

4.1.5 Mohutnost biofilmu

2D parametrizace struktury biofilmu pomocí obrazové analýzy prezentovaná v předkládané diplomové práci je vhodná pouze pro tenké vrstvy biofilmu. V průběhu kultivace mikroorganismů, v závislosti na rychlosti tvorby biofilmu, není optické hodnocení zcela korektní. Obrazová analýza pro mohutnější biofilmy zanedbává tloušťku biofilmu. Předkládané hodnocení je tedy určeno pro slabé vrstvy biofilmu. Na následujícím Obr. 38 je uvedena mohutnost biofilmu nanovláknenného nosiče druhého experimentu v závislosti na typu bioreaktoru a času odběru. Z obrázků je jasně patrný pozitivní vliv nízkého obsahu solí v médiu bioreaktorů na kinetiku růstu biofilmu. Nanovláknenný nosič umístěný do bioreaktoru 1 s nejnižší hodnotou salinity vykazoval v průběhu kultivace největší množství mikroorganismů tvořících biofilm.

Vzhledem k tomu, že soli jsou charakteristické vysokou adhezí k povrchu nosiče, povrchy nosičů umístěných zejména do bioreaktoru 3 s vysokým obsahem solí (vysoká měrná vodivost) byly z počátku kultivace pasivovány vrstvami solí. Mikroorganismy po své adaptaci na vysokou hodnotu salinity nejprve kolonizovaly povrch soli, a poté se dále rozšiřovaly po povrchu nosiče.



Obr. 38: Vývoj mohutnosti biofilmu na nanovlákněm nosiči při rozdílných hodnotách salinity média reaktoru

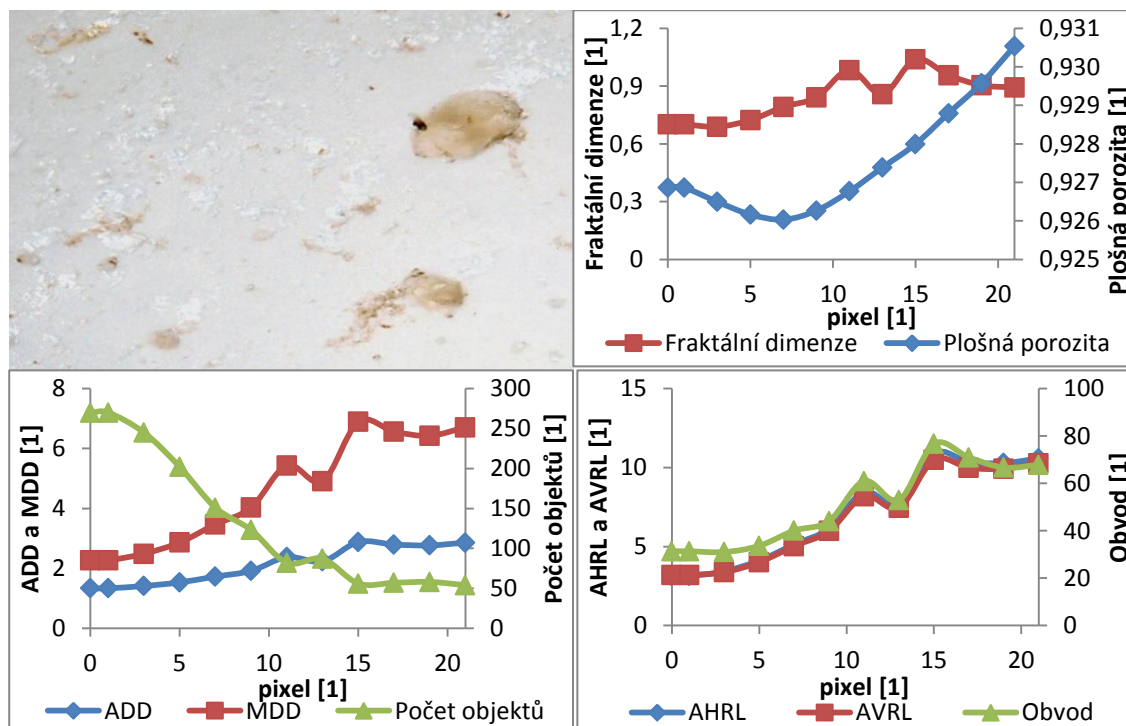
Jedním z řešení kvantifikace objemového zaplnění biofilmu je využití mikroskopu, který disponuje možností snímat objekty také v ose z. Obrazová analýza by tak umožňovala hodnotit parametry pozorovaných objektů ve 3D prostoru.

Při sledování kinetiky růstu biofilmu byl kladen velký důraz na dodržování stanovených podmínek v laboratorních bioreaktorech. Z tohoto důvodu byly po celou dobu kultivace mikroorganismů během obou experimentů měřeny a případně nastavovány hodnoty pH a měrné vodivosti živného média na požadované úrovni. Dále byla v reaktorech udržována konstantní teplota 20°C a byly také pravidelně měřeny hodnoty absorbance vzorků odebraných z jednotlivých bioreaktorů. Všechny naměřené hodnoty těchto veličin jsou součástí přiloženého DVD ve složce „Měřené veličiny“.

4.1.6 Vliv mediánového filtrování

K posouzení vlivu mediánové filtrace na vývoj hodnot kvantifikovaných parametrů byl použit snímek nosiče AnoxKaldnes K3 pořízený 14. den kultivace při

stonásobném zvětšení. Tento snímek byl následně podroben sledu operací zahrnujících ostření a úpravu jasu/kontrastu obrazu z důvodu přesnější identifikace objektů na snímku. Identifikované objekty odpovídají biofilmu na nosiči. Vliv velikosti masky mediánového filtru na průběh hodnot vypočtených parametrů je ilustrován na následujícím Obr. 39.



Obr. 39: Vliv mediánového filtrování na parametry 2D struktur

Absence mediánového filtru, aplikovaného taktéž na binární snímky, vedla k nízkým počátečním hodnotám většiny stanovených parametrů jako v případě hodnot uvedených v kapitole 2.3.9 dle literatury [6]. Rostoucí trend uvedených křivek se zvětšující se velikostí masky $[x, x]$ je shodný s trendy uvedenými v kapitole 2.3.9 u těchto parametrů: ADD, MDD, AHRL, AVRL a obvodu. Zejména na začátku filtrace se na snímku vyskytovaly po prahování četné izolované pixely nebo jejich malé shluky, které zvětšovaly procentuální zastoupení plochy obsazené biofilmem. Zvětšující se rozměr mediánového filtru redukoval tuto plochu kolonizovanou mikroorganismy. Hodnoty difuzních vzdáleností, běhových délek i obvodu objektů rostly díky úbytku počtu především rozměrově malých objektů. Z Obr. 39 je také patrný shodný vývoj charakteristik průměrné horizontální/vertikální délky běhu a obvodu objektů.

Vývoj plošné porozity i fraktální dimenze byl rozdílný vzhledem k uvedeným charakteristikám v teoretické části. Kvantitativní vyjádření hodnot plošné porozity

zpočátku klesá i přes úbytek nejmenších objektů (řádově jednotky pixelů) vzhledem k zaplnění pórů velkých objektů. Po zaplnění a postupné eliminaci lokalizovaných biofilmových struktur hodnoty AP lineárně rostly. Fraktální dimenze reflektující míru nepravidelnosti objektu je také výrazně ovlivněna existencí velkého množství malých objektů, které dosahovaly nižších hodnot než složitější větší objekty. Vývoj této charakteristiky měl opačný, mírně rostoucí trend, než jak tomu bylo v uvedené literatuře [6], a to do doby, kdy byly odstraněny ve filtrovaném obraze malé a méně složité biofilmové útvary. Poté byl vývoj hodnot tohoto parametru klesající.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce je zaměřena na hodnocení bakteriálního biofilmu na nosičích biomasy (polyethylenový AnoxKaldnes K3, PAQ_34 a nanovláknový) umístěných do bioreaktorů s různou hodnotou salinity, respektive měrné vodivosti. K tomuto účelu bylo nutné navrhnout vhodný metodický nástroj, pomocí kterého byla stanovena kinetika růstu mikroorganismů na zvolených nosičích biomasy. Jako prostředek ke stanovení kinetiky růstu, s širokým spektrem použitelnosti v technické praxi, byly použity metody analýzy obrazu s využitím programového prostředí Matlab 2009, ve kterém byla vytvořena aplikace umožňující popis a hodnocení 2D struktur biofilmu. Přednostmi obrazové analýzy jsou mimo jiné rychlost a objektivita hodnocení, automatizace výpočtů vlastností obrazu nebo možnost detailního popisu biofilmu na nosiči co do velikosti, orientace či uspořádání. Výstupy analýzy jsou prezentovány ve formě kvantifikovaných dat i v podobě názorného zobrazení, které je realizováno zpracováním stanovených hodnot parametrů do grafů.

Z užití moderní metody obrazového hodnocení biofilmu lze vyvodit následující závěry. Hlavním sledovaným parametrem obrazového hodnocení bylo pokrytí povrchu nosiče, resp. plošná porozita. Podle dosažených výsledků lze konstatovat, že na nanovláknových nosičích, díky svému specifickému měrnému povrchu a jeho morfologii, je urychlen primární úchyt mikroorganismů s následnou rovnoměrnou tvorbou kolonií vytvářejících stabilní biofilm. Celý systém, v porovnání s polyetylenovými nosiči, je více schopný přizpůsobit se nepříznivým a náhlým změnám podmínek a rovněž zajišťuje rychlejší a stabilnější biodegradaci fenolu. Bakteriální biofilm fixovaný na nanovláknovém smotku dosahoval vyšších hodnot plošného zaplnění. Z výstupů obrazové analýzy polyetylenových nosičů, i přes skokové výkyvy v některých sledovaných parametrech, vyplývá, že mírně lepších výsledků dosahoval komerční nosič AnoxKaldnes K3 než nosič PAQ_34. Lze také konstatovat, že charakter struktury biofilmu nosiče umístěného do bioreaktoru s existencí střížných sil (první experiment) se minimálně odlišoval oproti nosičům umístěným ve zkumavkách druhého experimentu, tj. absence střížných sil. Ve sledovaných charakteristikách se v případě obou experimentů u komerčních nosičů vyskytovaly skokové změny. Průběhy křivek zjištěných v experimentech s nanovláknovými nosiči vykazovaly obvykle rovnoměrný, v některých případech až téměř lineárně rostoucí/klesající trend.

Pomocí obrazové analýzy byl zjištěn a v souladu s predikcí dokázán příznivý vliv nízké hodnoty salinity (odpovídající nízké měrné vodivosti média) v bioreaktoru na kinetiku růstu bakteriálního biofilmu, a to u obou experimentů. V tomto případě minimální hodnota měrné vodivosti média činila $10 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Množství kolonizovaných bakterií na nosičích umístěných v médiích s hodnotou měrné vodivosti $40 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ vzhledem k předešlé míře znatelně ubývalo, a proto lze označit toto množství v případě této práce za „hraniční“. Tudíž média s nejvyšší hodnotou měrné vodivosti (nejvyšší salinitou), a sice 60 a $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ jsou nevhodná k organizované tvorbě společenstev bakterií v podobě biofilmu.

Níže jsou bodově uvedena shrnutí poznatků získaných z obrazové analýzy:

- Výsledky aplikace obrazové analýzy jsou závislé na několika faktorech. Stěžejním stimulem pro získání kvalitní obrazové informace z mikroskopických snímků je kvalitní zobrazovací technika, samotné nastavení parametrů snímacího zařízení, respektování základních pravidel fotografické techniky a také smýšlení uživatele, který sestavuje některé tyto aspekty. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím výstupy analýzy je dodržování kontinuálních podmínek v bioreaktorech, tzn., je nutné udržovat stálou teplotu, hodnotu měrné vodivosti i hodnotu pH.
- Optické hodnocení plošných parametrů je vhodné jen pro tenké vrstvy biofilmu a pro pomalu rostoucí mikrobiální populace.
- Vytvořená aplikace umožnila stanovit parametrizaci a kinetiku růstu bakteriálního biofilmu fixovaného na jednotlivých typech nosičů a umožnila tak jejich vzájemné porovnání.
- Zhodnoceny byly experimenty reaktorů s komparativním měřením hodnot měrné vodivosti a střížných sil. Z výše uvedených skutečností plyne, že k příznivému/rychlému růstu mikroorganismů přispívá jen minimální množství solí v médiu. Nadbytek solí zhoršuje schopnost kolonizace, mikroorganismy se nejprve musí na vysokou hodnotu měrné vodivosti/salinitu adaptovat. Absence střížných sil v bioreaktoru měla pozitivní dopad na míru kolonizace mikroorganismů na zvolených nosičích.
- Velký vliv na hodnocení biofilmu obrazovou analýzou má mediánové filtrování. S navyšující se velikostí filtru byly ovlivněny všechny 2D parametry. V rámci této práce je vhodné použít filtraci o malé velikosti masky, aby byly odstraněny

rozměrově malé a méně významné objekty a došlo k zaplnění malých pórů v lokalizovaných objektech.

- Vliv mediánové filtrace je individuální záležitostí vstupních snímků. Je důležité zvolit správně velikost filtru před tím, než bude přistoupeno k samotné kvantifikaci požadovaných parametrů.

V předložené práci se podařilo splnit všechny zadané cíle diplomové práce. Byla sestavena aplikace v programovém prostředí Matlab umožňující definovat parametry, které charakterizují strukturální povahu nárůstu biofilmu na nosičích biomasy pomocí analýzy obrazu pořízených snímků biofilmu. Na základě výsledků obrazové analýzy bylo také zvoleno optimální množství salinity v médiu bioreaktoru a nosič biomasy, který disponoval nejefektivnějším nárůstem bakteriálního biofilmu po celou dobu kultivace.

Seznam literatury

- [1] SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. *Mikrobiální biofilm / Časopis Vesmír / 80, 203, 2001/4 / vesmir.cz* [online]. 2001 [cited 2012-03-20]. Available from: <<http://www.vesmir.cz/clanek/mikrobalni-biofilm>>.
- [2] DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Biofilms: Microbial Life on Surfaces* [online]. 2002 [cited 2012-03-23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732559/#__sec2>.
- [3] Transgalactic Ltd. What Is Biofilm? [online]. 2010 [cited 2012-03-23]. Automation in Microbiology and Biosciences. Available from: <http://www.bionewsonline.com/n/what_is_biofilm.htm>.
- [4] Center for Biofilm Engineering: Biofilm research & education relevant to industry, health, and the environment | Center for Biofilm Engineering [online]. 2008 [cited 2012-03-20]. Biofilm basics | Center for Biofilm Engineering. Available from: <<http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics.html>>.
- [5] DUB, T. *Využití moderních metod pro hodnocení vývoje bakteriálního biofilmu na nanovlákněné textilii: diplomová práce*. Liberec: TUL, 18. 5. 2012. 77 p.
- [6] LEWANDOWSKI, Z., BEYENAL, H. *Fundamentals of biofilm research*. 1st ed. CRC Press, 2007. 480 p. ISBN 0-8493-3541-8.
- [7] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., Biologické čištění odpadních vod. [online]. 2007 [cited 2012-06-20]. Available from: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B022>.
- [8] *Aktivovaný kal*: studijní text z předmětu Aplikovaná hydrobiologie UP Olomouc. Katedra ekologie a životního prostředí. [cited 2012-06-20]. Available from: <<http://ekologie.upol.cz/ku/ahdo/Aktivovan%fd%20kal.doc>>.
- [9] ČERMÁKOVÁ, J., et al. Biologické čištění odpadních vod. [online]. [cited 2012-06-20]. Available from: <<http://vitejtenazemi.cenia.cz/slovník/index.php?article=76>>.
- [10] Vodní zdroje Ekomonitor spol. s r.o. Biologické čištění vod | www.cisticka-odpadnich-vod.eu [online]. 2009 [cited 2012-06-20]. Available from: <<http://www.cisticka-odpadnich-vod.eu/otazky-a-odpovedi/biologicke-cistenivod>>.
- [11] *Biodegradace a biodeteriorace*: sylabus k předmětu Základy biodegradace a biodeteriorace. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. [cited

- 2012-06-20]. Available from:
<http://eso.vscht.cz/cache_data/1175/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/biodeg_biodet.pdf>.
- [12] HORÁKOVÁ, D. Bioremeriace [online]. 1.st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cited 2012-06-20]. Available from:
<<http://is.muni.cz/elportal/?id=710435>>.
- [13] KŘIKLAVOVÁ, L. Vývoj nanovlákného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur. [online]. [cited 2012-08-15]. Available from:
<http://www.nti.tul.cz/cz/images/0/05/Seminar_120118_kriklavova.pdf>.
- [14] MADARA, P., et al. Provozování půdních biofiltrů v podmínkách zařízení na odstraňování nebo využití konfiskátů živočišného původu a živočišného odpadu. [online]. [cited 2012-08-18]. Available from:
<<http://www.cschi.cz/odour/files/0910-seminar/Biofiltry-popis.pdf>>.
- [15] An introduction to biofilm wastewater treatment. [online]. [cited 2012-08-11]. Available from: <<http://www.anoxkaldnes.com/news-resources/technology-information/mbbr.htm>>.
- [16] AnoxKaldnes™ MBBR - Použití. [online]. 2012 [cited 2012-08-11]. Available from: <<http://www.veoliawaterst.com/mbbr/cz/applications.htm>>.
- [17] LEDERER, T., et al. Čištění podzemních vod kontaminovaných fenoly v MBBR. [online]. [cited 2012-08-13]. Available from:
<<http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/lederer.pdf>>.
- [18] KOČÁROVÁ, J. Výzkum biologického čištění průmyslových vod. [online]. [cited 2012-08-20]. Available from:
<<http://tuni.tul.cz/gf/print.php?id=eDUzODQ=x>>.
- [19] PETRÁŠ, D., KIMMER, D., SOUKUP, K., KLUSON, P. Bezpečná nanovlákná. [online]. [cited 2012-08-30]. Available from:< http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_12_1009-1016.pdf>.
- [20] YANG, X., BEYENAL, H., HARKIN, G., LEWANDOWSKI, Z., Quantifying biofilm structure using image analysis. Journal of Microbiological Methods, 2000, vol. 39, no. 2, p. 109–119. Available from:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701299000974>>.

- [21] HARALICK, R. M., SHANMUGAM, K., DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. [online]. 200? [cited 2012-03-28]. Available from: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=4309314>>.
- [22] LICEV, L., SOJKA, Š. Rozpoznávání zájmových bodu a objektu na snímcích. [online]. 2009 [cited 2012-03-29]. Available from: <http://gis.vsb.cz/GIS_Ostrava/GIS_Ova_2009/sbornik/Lists/Papers/002.pdf>.
- [23] KŘÍŽEK, P. Filtrace obrazu. [online]. 2000 [cited 2012-04-01]. Available from: <<http://www.volny.cz/krizekp1/zso/uloha3.html>>.
- [24] CHUDOBA, J., DOHÁNYOS, M., WANNER, J., Biologické čištění odpadních vod. 1st ed. Praha: STNL, 1991. 468 p. ISBN 80-03-00611-2.
- [25] Úprava pH. [online]. [cited 2012-12-09]. Available from: <<http://www.prominent.cz/tabid6163/tabid6287/%C3%9Aprava-pH.aspx>>.
- [26] Katalog Měřicí technika pro laboratoře a životní prostředí 2011. [online]. [cited 2012-12-09]. Available from <<http://www.wtwcz.com/index.php?s=3>>.
- [27] KABEŠ, K. Přístroje pro měření elektrolytické vodivosti – přehled trhu. [online]. 2005 [cited 2012-11-11]. Available from: <<http://www.automatizace.cz/article.php?a=597>>.
- [28] Olympus - E-510. [online]. [cited 2012-07-28]. Available from: <http://www.olympus.cz/consumer/dslr_E-510.htm>.
- [29] PĚNKAVA, J. iFotoVideo.cz | Olympus E-510. [online]. 2007 [cited 2012-07-28]. Available from: <http://www.ifotovideo.cz/rubriky/foto/zrcadlovky/olympus-e-510_1014.html>.
- [30] Návod k obsluze mikroskopu Olympus BX51M.
- [31] Olympus Česká republika. 2010 [online]. [cited 2012-07-28]. Available from: <http://www.olympus.cz/microscopy/26_BX51_BX51M_Key_Features.htm>.
- [32] PROMICRA - QuickPHOTO MICRO 2.3. [online]. [cited 2012-07-20]. Available from: <http://www.vtpup.cz/common/manual/Extern_Designfoods_Promicra_QuickphotoMicro23_datasheet_CZ.pdf>.
- [33] QuickPHOTO MICRO 2.3, Uživatelská příručka.
- [34] PROMICRA - Modul Deep Focus 3.1. [online]. [cited 2012-07-20]. Available from: http://www.promicra.cz/pdf/Deep_focus_3.1_biologie_CZ.pdf>.

- [35] KŘÍKLAVOVÁ, L. *HODNOCENÍ MÍRY KOLONIZACE NA NOSIČI BIOMASY VYUŽITÍM OBRAZOVÉ ANALÝZY: článek*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2012.
- [36] ANALÝZA OBRAZU (VIDEO IMAGE ANALYSIS). [online]. [cited 2012-10-11]. Available from: http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/MATLAB11/prispevky/100_rejta.pdf.
- [37] KALOVÁ, I. *Pedzpracování obrazu* [online]. [cited 2012-10-11]. Available from: <http://www.uamt.feec.vutbr.cz/vision/TEACHING/MPOV/02%20-%20Predzpracovani%20obrazu.pdf>.
- [38] ŠPIČKA, I., FISCHER, R. POČÍTAČOVÁ GEOMETRIE A GRAFIKA. [online]. 2002 [cited 2012-11-14]. Available from: <http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/PGG/Pocitacova%20geometrie%20a%20grafika.pdf>.
- [39] POSPÍŠILOVÁ, J., ROUŠAROVÁ, L. Barvové prostory. [online]. 2010 [cited 2012-11-15]. Available from: <http://geo3.fsv.cvut.cz/vyuka/kapr/sp/2010/soul/index.html>.
- [40] ZMEŠKAL, O., ČEPPAN, M., DZIK, P. Barevné prostory a správa barev. [online]. 2002 [cited 2012-11-11]. Available from: http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci/download/stud06_rozn02.pdf.
- [41] HSL and HSV. [online]. [cited 2012-09-29]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/HSL_and_HSV.
- [42] Image Processing Laboratory. [online]. [cited 2012-09-30]. Available from: <http://ipl.ce.sharif.edu/>.

Příloha A – Obsah DVD

- Elektronická verze diplomové práce ve formátu *.doc a *.pdf
- Složka Program – vytvořený programový kód v prostředí Matlab
- Složka Měřené veličiny – hodnoty měřených veličin po dobu kultivace ve formátu *.xlsx
- Složka Snímky – mikroskopické snímky nosičů biofilmu